



ผลของระยะการสุกต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่



โดย

นางสาวทัตพิชา กายเย็น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลของระยะการสุกต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่



โดย
นางสาวทัตพิชา กายเย็น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

EFFECT OF MATURATION STAGE ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF *CARISSA*
CARANDAS



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2017
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ ผลของระยะการสุกต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่
โดย ทัดพิชา กายเย็น
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศน์วงศ์)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา วัฒนการุณ)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร ตรงจิตภักดี)

58401212 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : มะม่วงหาวมะนาวโห่, ระยะเวลาสุก, คุณสมบัติน้ำตาล-กายภาพ, การต้านอนุมูลอิสระ, การป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ, การต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย, การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, กิจกรรมต้านการอักเสบ

นางสาว ทัดพิชา กายเย็น: ผลของระยะเวลาสุกต่อคุณสมบัติน้ำตาลของมะม่วงหาวมะนาวโห่
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข

คุณสมบัติน้ำตาลของผลไม้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาสุก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมี รวมไปถึงกิจกรรมทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีระยะเวลาสุกที่แตกต่างกัน 4 ระยะ คือ ผลดิบ ห้าม แก่และสุก โดยตรวจสอบคุณสมบัติน้ำตาล-กายภาพ ได้แก่ สี ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) พีเอช (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด (TA) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TAC) และปริมาณวิตามินซี ตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP assay ในขณะที่ยังมีการศึกษาการเสถียรภาพของโปรตีนอัลบูมิน (albumin) ถูกใช้สำหรับทดสอบการต้านการอักเสบ กิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียถูกประเมินโดยใช้วิธี Disc diffusion ยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียที่ต่างกัน คือ แกรมบวก (+) และแกรมลบ (-) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (7-10 °Brix) ปริมาณน้ำตาล (4.08-20.74 mg glucose/g fresh weight) ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน (118.36-337.70 µg GAE/g fresh weight, 133.24-658.43 µg RE/g fresh weight และ 0.42 to 61.47 µg/g fresh weight ตามลำดับ) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาสุก แต่ปริมาณกรดมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (3.84-2.43% citric acid equivalent) ส่วนปริมาณวิตามินซีนั้นเพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับระยะเวลาสุก (0.0045-0.0300 mg/g fresh weight) แต่ลดลงอย่างมากที่ระยะผลสุก (0.0070 mg/g fresh weight) นอกจากนี้ประสิทธิภาพของกิจกรรมต้านการอักเสบ การป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ การต้านเชื้อแบคทีเรีย และกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาสุกอีกด้วย จากการศึกษาพบ ว่า ระยะเวลาสุกของผลไม้เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดคุณสมบัติน้ำตาล-กายภาพและทางชีวภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ดังนั้น เกษตรกรควรเลือกเวลาเก็บเกี่ยวผลไม้ที่ระยะเวลาสุกที่เหมาะสมเพื่อจะเข้าถึงศักยภาพสูงสุดในด้านทางการค้าและประโยชน์กับสุขภาพ

58401212 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : *Carissa carandas*, Antioxidant activity, Physico-chemical properties, DNA damage protection, Antibacterial, Anti-tyrosinase, Anti-inflammatory activity, Ripening stage

MISS THUTPICHA KAYYEN : EFFECT OF MATURATION STAGE ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF *CARISSA CARANDAS* THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR SIRIPORN PHONGTONGPASUK

Nutraceutical property of fruits can be depended on the stage of ripening. Hence, the objective of this study was to investigate the physical and chemical changes as well as biological activities of *Carissa carandas* fruit at four different maturation stages: unripe, medium-ripe, ripe and fully-ripe. Physico-chemical properties such as color, total soluble solid (TSS), pH, titratable acidity (TA), total sugar, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total anthocyanin content (TAC) and total vitamin C content were investigated. The antioxidant capacity was determined by DPPH scavenging activity and ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) while inhibition of albumin denaturation was introduced for the evaluation of anti-inflammatory property. Antibacterial activity was assessed by disc diffusion method against different gram positive (+) and negative (-) bacterial strains. The result demonstrated remarkable increases in TSS (7 to 10 °Brix), total sugar (4.08 to 20.74 mg glucose/g fresh weight), TPC, TFC, TAC (118.36 to 337.70 µg GAE/g fresh weight, 133.24 to 658.43 µg RE/g fresh weight and 0.42 to 61.47 µg/g fresh weight, respectively) and antioxidant activity, together with significant decrease in TA with the advancing ripening stage (3.84 to 2.43% citric acid equivalent). Interestingly, total vitamin C content increased in parallel with the ripening stage (0.0045-0.0300 mg/g fresh weight) however drastically declined at the full-ripened stage (0.0070 mg/g fresh weight). Furthermore, the efficiency of the anti-inflammatory activity, DNA damage protection, antibacterial and anti-tyrosinase activity were ripening dependent. The study has revealed that fruit ripening is an important factor determining the physico-chemical properties and biological profiles of this promising fruit "*Carissa carandas*". Therefore, it is possible for orchard growers to choose harvesting time at relevant ripening stages with intended commercial purpose and health benefit.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริพร พงศ์ทองผาสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาการวางแผนงานวิจัย และการตรวจแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา วัฒนการุณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุจิ กาญจน์ นาสนิต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร ตรงจิตภักดี ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ส่งผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนา มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำการศึกษ ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยเหลือ และที่สำคัญยิ่งต้องขอกราบขอบพระคุณพ่อแม่ และครอบครัวที่คอยสนับสนุนเป็นอย่างดี จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี



ทัตพิชา กายเย็น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 อนุมูลอิสระ.....	4
2.2 การเกิดอนุมูลอิสระ.....	6
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	11
2.4 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	12
2.5 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	22
2.6 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช.....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 ผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง.....	27
3.2 แยกที่เรียที่ใช้ในการทดลอง.....	27

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	27
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	28
3.5 ระเบียบวิธีวิจัย.....	30
3.5.1 ตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมี-กายภาพ	30
3.5.2 การทดสอบปริมาณสารพิษเคมี	32
3.5.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	33
3.5.4 DNA nicking assay.....	34
3.5.5 การทดสอบกิจกรรมต้านการอักเสบ	34
3.5.6 การทดสอบคุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	35
3.5.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	35
3.5.8 การหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ HPLC.....	36
3.5.9 การวิเคราะห์ปริมาณแอสโทไซยานินโดยใช้ HPLC.....	36
3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ (Statistical analysis).....	37
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	38
4.1 ตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ	38
4.2 ตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	41
4.3 ทดสอบการป้องกันการแตกหักของ DNA (DNA nicking assay).....	46
4.4 กิจกรรมต้านการอักเสบ (<i>In vitro</i> anti-inflammatory activity).....	48
4.5 การทดสอบคุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	50
4.6 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase activity)	52
4.7 การหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ HPLC.....	54
4.8 การหาปริมาณแอสโทไซยานินโดยใช้ HPLC	56
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	58
ภาคผนวก ก.....	59

รายการอ้างอิง 70

ประวัติผู้เขียน 80



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการเป็น Radical ของโมเลกุล (Lockwood, 2007).....	5
ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ ROS ที่เกิดจากปัจจัยภายนอกร่างกาย.....	9
ตารางที่ 3 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มต่างๆ	14
ตารางที่ 4 โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มต่างๆ.....	16
ตารางที่ 5 คุณลักษณะทางกายภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน	38
ตารางที่ 6 ค่าสีในระบบ CIE ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน	39
ตารางที่ 7 ลักษณะทางเคมีของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน.....	40
ตารางที่ 8 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โมโนเมอร์อินทรีย์ไอโซยานิน (pH-differential method) ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน	41
ตารางที่ 9 การทดสอบกิจกรรมการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน	44
ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Antibiotics และมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ (50 mg/mL) ที่ระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง.....	50
ตารางที่ 11 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ ความเข้มข้น 1 mg/mL.....	52

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การทำงานของเอนไซม์ Lipoxygenase (LOX) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน.....	7
ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก.....	13
ภาพที่ 3 โครงสร้างพื้นฐานของสารฟลาโวนอยด์	15
ภาพที่ 4 ตำแหน่งการดักจับไอออนโลหะของฟลาโวนอยด์.....	17
ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Hydrogenated carotenoid derivatives	18
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ Oxygenated carotenoid derivatives ได้แก่ ลูทีน (บน).....	18
ภาพที่ 7 โครงสร้างของ All-trans beta-carotene, 9-cis beta-carotene	19
ภาพที่ 8 โครงสร้างพื้นฐานของวิตามินอี.....	20
ภาพที่ 9 โครงสร้างพื้นฐานของวิตามินซี.....	20
ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของวิตามินซี	21
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างวิตามินอี วิตามินซีและกลูตาไทโอน	21
ภาพที่ 12 กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์	23
ภาพที่ 13 การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน	24
ภาพที่ 14 ลักษณะทางกายภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีระยะเวลาการสุกแตกต่างกัน	30
ภาพที่ 15 การป้องกันความเสียหายของ DNA จากสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ (200 µg/mL) Lane 1: Control (Distilled water + DNA) Lane 2: Positive control (DNA + Rutin + Fr) Lane 3: Negative control (DNA + Fr) Lane 4, 5, 6, 7: มะม่วงหาวมะนาวโห่ (ระยะผลดิบ, ห่าม, แก่ และสุก ตามลำดับ) + DNA + Fr เมื่อ Fr = Fenton's reagent	46
ภาพที่ 16 ปริมาณ DNA (%) ในแต่ละรูปแบบที่ได้จาก agarose gel ซึ่งแสดงในภาพที่ 15 โดยใช้ โปรแกรม ImageJ ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ.....	46
ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเสียหายของโปรตีนของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความ เข้มข้น 100, 200 และ 500 µg/mL ที่มีระยะเวลาการสุกที่ต่างกัน เมื่อ std คือ Diclofenac sodium, st1 คือ ผลดิบ, st2 คือ ผลห่าม, st3 คือ ผลแก่ และ st4 คือ ผลสุก	48

ภาพที่ 18 HPLC โครมาโตแกรม (1) Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.2 mg/ml 54

ภาพที่ 19 HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ..... 54

ภาพที่ 20 HPLC โครมาโตแกรม (1) Cyanidin-3-glucoside ความเข้มข้น 1.0 mg/ml..... 56

ภาพที่ 21 HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ..... 56



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เป็นสารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชันที่สร้างความเสียหายต่อร่างกาย ซึ่งร่างกายของเราสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้หลายชนิด เช่น Superoxide dismutase (SOD), Catalase และ Glutathione peroxidase แต่เมื่ออายุเพิ่มขึ้นความสามารถของร่างกายในการสร้างสารเหล่านี้จะลดน้อยลง และไม่เพียงพอในการกำจัดอนุมูลอิสระจึงจำเป็นต้องมีการบริโภคเพิ่มเข้าไป ปัจจุบันมีข้อมูลจากการศึกษาวิจัยพบว่า การรับประทานผักและผลไม้มีความสัมพันธ์กับการลดอุบัติการณ์ของการเกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communicable chronic diseases) เช่น โรคหัวใจ และหลอดเลือด (Ames et al., 1993; Dragsted, 2003) โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคมะเร็ง (Terry et al., 2001) ทั้งนี้ เนื่องจากเยื่อใย วิตามิน แร่ธาตุในผักผลไม้ และปัจจัยสำคัญอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดความสัมพันธ์เชิงบวกดังกล่าว คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ Flavonoids, phenolic acid, tannin และ Vitamins ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย เช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระและกำจัดสารพิษ ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน การควบคุมวิถีการส่งทอดสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (Signal transduction pathway) ที่ควบคุมกระบวนการอักเสบ หรือควบคุมกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง (Han et al., 2007; Manach et al., 2005; Pan et al., 2008) ผักและผลไม้ต่างๆ จึงเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดงานค้นคว้าวิจัยหาสารต้านอนุมูลอิสระจากผักและผลไม้มากขึ้น การบริโภคผักและผลไม้จะช่วยให้อายุยืนยาวขึ้น เพราะพืชอาหารมีสัดส่วนของน้ำสูง ให้ปริมาณของเส้นใยและฟรุกโตสที่มาก และเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินและแร่ธาตุ (Pajk et al., 2006) ผู้บริโภคจึงได้ให้ความสนใจในการนำผักผลไม้และผลิตภัณฑ์จากผักผลไม้มารับประทาน หรือเพื่อใช้บำรุงรักษาสุขภาพ นอกจากนี้ ยังนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอีกด้วย

มะม่วงหาวมะนาวโห่ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Carissa carandas* Linn. อยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อเรียกอื่นๆ เช่น มะนาวไม่รู้โห่, มะนาวโห่, หนามขี้แฮด และหนามแดง เป็นไม้พุ่มยืนต้น สูงราว 2-5 เมตร มีดอกเล็กสีขาว โคนดอกมีสีชมพู ส่วนผลเป็นผลเดี่ยวออกรวมกันเป็นช่อ ผลอ่อนมีสีชมพู และค่อยๆ เข้มขึ้นเป็นสีแดง กระทั่งสุกจึงกลายเป็นสีดำ มีสรรพคุณทางยาสมุนไพร ผลดิบมีรสเปรี้ยว แก้ท้องผูก ลดไข้ ละลายเสมหะ แก้โรคเบื่ออาหาร แก้ท้องร่วง โรคของสมอง และอาการอาเจียนเป็นเลือด ส่วนผลสุกมีรสหวาน แก้โรคลักปิดลักเปิด แก้โรคเกี่ยวกับน้ำดี แก้โรคเบื่อ

อาหาร แก้อาการปวดแสบปวดร้อนตามผิวหนังและอาการคัน แก้อโรคริด แก้อโรคลิหิตจาง (Kumar et al., 2013) ด้วยสรรพคุณทางยาที่มีมากมายนี้ มะม่วงหาวมะนาวโห่จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของพืชที่สำคัญในการใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมทางโภชนาการที่มีบทบาทในการพัฒนาสุขภาพให้ดีขึ้น (Sarma et al., 2015) ซึ่งในปัจจุบันผู้บริโภคที่รักสุขภาพได้เริ่มหันมาสนใจผลไม้ชนิดนี้มากขึ้น เนื่องจากวงการแพทย์ได้ระบุว่า มะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ทางยา สามารถนำไปใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น อาหารไม่ย่อย บรรเทาอาการไข้ อาการคัน โรคหิด ยาแก้ปวดท้อง และอื่นๆ อีกมากมาย อีกทั้งยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Kumar et al., 2013)

ทั้งนี้ ปัจจัยต่างๆ (สภาพภูมิอากาศ เทคนิคการเพาะปลูก ลักษณะตามพันธุกรรม และระยะเวลาเก็บเกี่ยว) อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของพืชอาหาร และอาจมีบทบาทสำคัญในการกำหนดองค์ประกอบของสารฟีนอลิกและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบนั้น (Imeh & Khokhar, 2002) ระยะเวลาการสุกของผลไม้เป็นอีกปัจจัยสำคัญที่บ่งบอกคุณลักษณะขององค์ประกอบที่มีในผลไม้และผัก ซึ่งในระหว่างการสุกของผลไม้ได้มีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางชีวเคมีทางสรีรวิทยาและทางโครงสร้างขึ้น และการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดคุณลักษณะของผลไม้ ดังนั้น ระยะเวลาการสุกของผลไม้มีผลต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ และด้วยผลมะม่วงหาวมะนาวโห่นั้นมีระยะเวลาการสุกถึง 4 ระยะ จึงทำให้มีการเก็บเกี่ยวระยะการสุกที่ไม่เท่ากันมาขายตามท้องตลาด หรือเวลาซื้อผลมะม่วงหาวมะนาวโห่เพื่อนำไปแปรรูปเป็นน้ำผลไม้ นั้น จะรับมาด้วยระยะเวลาการสุกที่ไม่เท่ากัน จึงทำให้เกิดปัญหาในเรื่องปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และปริมาณสารพฤกษเคมีที่ได้นำไปใช้ประโยชน์มีศักยภาพที่ไม่มากพอตรงตามคุณสมบัติ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณลักษณะทางเคมี-กายภาพ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ปริมาณสารพฤกษเคมี และคุณสมบัติทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่ต่อระยะเวลาการสุก เพื่อวัตถุประสงค์ทางการค้าในการตัดสินใจเลือกซื้อผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ตามระยะเวลาการสุกให้เกิดประโยชน์ที่เหมาะสมแก่ความต้องการ และสำหรับประเมินระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดที่จะเข้าถึงศักยภาพสูงสุดของคุณสมบัติต่างๆ ในผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการสุกที่มีต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารพฤกษเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เตรียมผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ใน 4 ระยะ คือ ดิบ ห่าม แก่ และสุก

1.3.2 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ค่าพีเอช (pH), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid), ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar), การวิเคราะห์ค่าสีในระบบ CIE และการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

1.3.3 วัดปริมาณสารพฤกษเคมี ประกอบด้วยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) และปริมาณแอนโทไซยานิน (Monomeric anthocyanins)

1.3.4 ตรวจสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay และ FRAP assay

1.3.5 ทดสอบการป้องกันการแตกหักของ DNA

1.3.6 การทดสอบกิจกรรมด้านการอักเสบ

1.3.7 ทดสอบคุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

1.3.8 ทดสอบคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1.3.9 วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณวิตามินซีด้วย HPLC

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบผลของระยะการสุกของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารพฤกษเคมี เพื่อประเมินระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดที่จะเข้าถึงศักยภาพสูงสุด

1.4.2 ทำให้ทราบคุณสมบัติทางชีวภาพต่างๆ ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

1.4.3 สามารถนำประโยชน์ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ไปเผยแพร่ให้กับบุคคลทั่วไปได้

1.4.4 สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและวิจัยคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากพืชอื่นๆ ที่น่าสนใจต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electrons) ในอะตอม หรือโมเลกุล พบได้ในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระ และว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไป เพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)



อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (Lipid) โปรตีน (Protein) เอนไซม์ (Enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (Cell membrane) คอลลาเจน (Collagen) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคชรา (Aging) โรคมะเร็ง (Cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (Coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (Arthritis) โรคภูมิแพ้ (Allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหน็บชา โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Ames et al., 1993) อย่างไรก็ตาม การที่จะสรุปว่าอนุมูลอิสระทุกชนิดเป็นสารพิษต่อร่างกายนั้นไม่ถูกต้องนัก สิ่งที่จะนำมาใช้บอกระดับความเป็นพิษควรจะเป็นความสามารถในการ Oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายมากกว่า สารที่มีความสามารถในการ Oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ Reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ Reactive chlorine species และ Reactive nitrogen species ตามโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation อาจจะได้พบได้ในรูปของ Lipid radical หรือ Genetic radical RS นั้นไม่จำเป็นว่าจะต้องอยู่ในรูปของ Free radical เสมอไป สารประกอบบางโมเลกุลที่อยู่ในรูป Non-radical แต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา Oxidation เช่น H_2O_2 ก็จัดเป็น RS เช่นกัน (ตารางที่ 1) (Lockwood, 2007)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการเป็น Radical ของโมเลกุล (Lockwood, 2007)

Reactive oxygen species			
Free radicals	Formula	Non-radicals	Formula
Oxygen radical	$O_2\cdot$	Singlet oxygen	$^1O_2^*$
Superoxide radical	$O_2^{\cdot-}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hydroxyl radical	$OH\cdot$	Ozone	O_3
Hydroperoxyl radical	$HO_2\cdot$	Organic peroxide	ROOH
Peroxyl radical	$RO_2\cdot$		
Alkoxy radical	$RO\cdot$		
Carbonate radical	$CO_3^{\cdot-}$		
Reactive chlorine species			
Chlorine radical	$Cl\cdot$	Hypochloric acid	HOCl
		Nitryl chloride	NO_2Cl
		Chlorine gas	Cl_2
Reactive nitrogen species			
Nitric oxide radical	$NO\cdot$	Nitric oxide	HNO_2
Nitrogen dioxide radical	$NO_2\cdot$	Peroxynitrite	$ONOO^-$
		Peroxynitrous acid	ONOOH
		Nitryl chloride	NOOCl

ROS นั้นเกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่างๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้นและทำให้เกิดภาวะ Oxidative stress ขึ้นได้ ภาวะ Oxidative stress นั้นหากเกิดขึ้นในระยะเวลายาวนานๆ เพียงชั่วขณะนั้นจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก (Nimse & Pal, 2015) แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีผลไปทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ เยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึง DNA และจะนำไปสู่โรคในหลายระบบและนำไปสู่ความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ได้ เช่น โรคใน

ระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคทางสมองและระบบประสาท เช่น Parkinson และ Alzheimer ผลต่อระบบต่อมไร้ท่อต่างๆ มะเร็ง รวมไปถึงมีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนัง (Cornelli, 2009; Li et al., 2013) จากการศึกษาพบว่าภาวะ Oxidative stress นั้นเป็นสาเหตุของโรค และร่างกายจะมีภาวะนี้เมื่อเป็นโรคบางอย่าง ซึ่งภาวะ Oxidative stress ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรคเหล่านี้ให้เห็นได้ชัด

2.2 การเกิดอนุมูลอิสระ

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะมีการใช้ออกซิเจนเพื่อการดำรงชีวิต และจะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่มากมาย ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free radical chain reaction) ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน (Pratt & Hudson, 1990) การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้มีสาเหตุมาจากปัจจัยภายในและภายนอกในร่างกาย

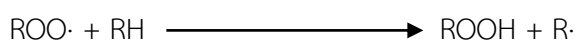
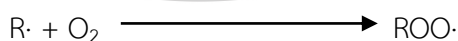
2.2.1 ปัจจัยภายในร่างกาย

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Auto oxidation) (Nawar, 1996)

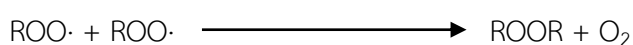
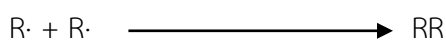
ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรกเรียกว่า อินิทิเอชัน (Initiation step) เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ มักเกิดจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (Hydrolysis) แสง (Photolysis) รังสี (Radiolysis) หรืออนุมูลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ขั้นตอนที่สองเรียกว่าพรอบพาเกชัน (Propagation step) เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลตัวอื่น อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินิทิเอชันจะดำเนินปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง ในขั้นตอนพรอบพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทางคือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียงหรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ Ground state ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่



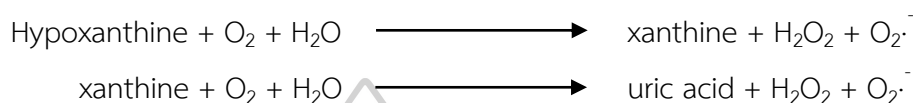
ขั้นตอนสุดท้ายเรียกว่า ขั้นตอนเทอร์มิเนชัน (Termination step) เป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ



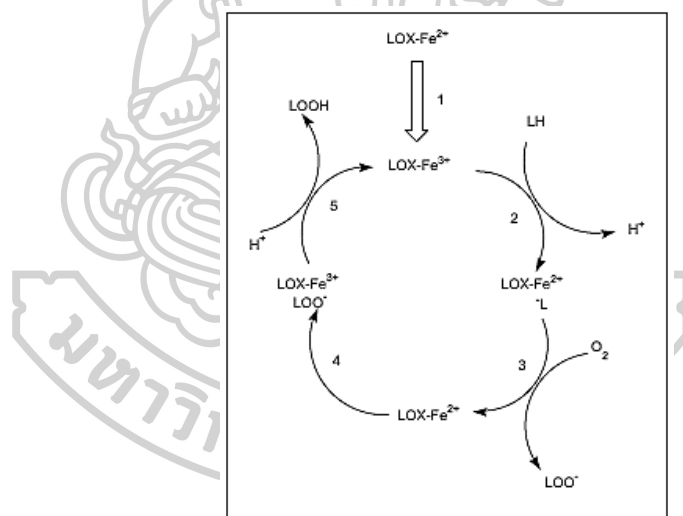
ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (Halliwell et al., 1995)

การทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ได้แก่

1) เอนไซม์แซนธินออกซิเดส (Xanthine oxidase: XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (Purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโปแซนธิน (Hypoxanthine) เป็นแซนธิน (Xanthine) และแซนธินเป็นกรดยูริก (Uric acid) พร้อมกับเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนให้เกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) ดังสมการ



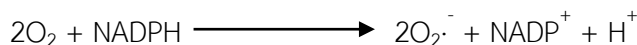
2) เอนไซม์ไลโปออกซีจีเนส (Lipoxygenase: LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมัน และเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมัน เกิดเป็นไฮดรอกซีเพอรอกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การทำงานของเอนไซม์ Lipoxygenase (LOX) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน
ที่มา: (Halliwell et al., 1995)

กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อชั้นนอก (Outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการ



นอกจากนี้ ในเม็ดสี (Granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ไมอีโพลเพอรอกซีเดส (Myeloperoxidase) ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปคลอรัส (Hypochlorus, HOCl) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ตั้งสมการ



โลหะทรานสิชัน (transition metal) (Halliwell, 1999)

โลหะทรานสิชัน 2 ชนิดคือ เหล็ก (Fe^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิล จากซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction) ตั้งสมการ



2.2.2 ปัจจัยภายนอกในร่างกาย

2.2.2.1 ยารักษาโรคบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน

2.2.2.2 การใช้รังสีในการรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X-ray) รังสีแกมมา (γ -ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายเทพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป (Secondary reaction) กับออกซิเจนละลายอยู่ในเซลล์นั้น ได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น (Halliwell et al., 1995)

2.2.2.3 คิวโนนรี มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO^{\cdot}) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนเตรต (ONOO^{\cdot}) รวมทั้งสารพิษ ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอนไซม์ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเจส (Cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว (Bast et al., 1991)

2.2.2.4 โอโซน ไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (Valacchi, 2004)

ตัวอย่างของ ROS ที่เกิดจากปัจจัยภายนอกในร่างกายแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ ROS ที่เกิดจากปัจจัยภายนอกร่างกาย

ROS generated from exogenous sources	
Air & water pollution	Ultraviolet light
Alcohol	Cooking (smoked meat, used oil, fat)
Tobacco smoke	Drugs such as Halothene, Paracetamol, Bleomycine, Doxorubicin, Metrenidazole, Ethanol.
Transition metals- Cd, Hg, Pb, As	CCl ₄
Heavy metals- Fe, Cu, Co, Cr	Pesticides
Industrial solvents	High temperature

ที่มา: (Phaniendra et al., 2015)

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระและ ROS มีผลกระทบต่อร่างกายในหลายรูปแบบ โดยรวมคือการทำลายสมดุลของระบบต่างๆ หรือก่อให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบของเซลล์ เช่น ทำลายองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ได้แก่ Lipid bilayer และ Integral protein เป็นผลให้เกิดความผิดปกติและการตายของเซลล์ (อัญชญา เจนวิถีสุข, 2544) นอกจากนี้ พบว่าการปรากฏของ ROS ปริมาณสูงในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) จะช่วยเร่งการสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ของไมโทคอนเดรีย ทำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียถูกทำลายเร็วขึ้น

อนุมูลอิสระสามารถทำลายพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ของสารประเภทโปรตีน ซึ่งกรดอะมิโน (Amino acid) ที่เป็นองค์ประกอบย่อยของโปรตีนต่างๆ นั้น มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) สูง โดยเฉพาะการทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิล (OH[·]) ทำให้เกิดการแตกหักหรือเปลี่ยนแปลงของพันธะ ซึ่งจะนำไปสู่ความผิดปกติและการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ต่างๆ โดยกรดอะมิโนทุกชนิดล้วนเป็นเป้าหมายของปฏิกิริยาดังกล่าว แต่โมเลกุลของกรดอะมิโนที่สำคัญในกรณีนี้ ได้แก่ ไทโรซีน (Tyrosine) ฮิสทีดีน (Histidine) เมไธโอนีน (Methionine) และซิสเทอีน (Cysteine) (Campanella et al., 2007)

นอกจากนั้น อนุมูลอิสระยังสามารถทำลายดีเอ็นเอ (DNA: deoxyribonucleic acid) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเป็นที่ทราบกันดีว่า ความเสียหายของดีเอ็นเอส่วนมากมักเกิดจากการได้รับรังสีต่างๆ แต่ความเสียหายโดยตรงที่ดีเอ็นเอได้รับจากรังสีนั้นเป็นเพียง 20% ของความเสียหายทั้งหมดเท่านั้น สาเหตุหลักที่แท้จริงของความเสียหายของดีเอ็นเอดังกล่าว มาจาก ROS ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำเนื่องจากการได้รับรังสี (Tian et al., 2007) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดจากอนุมูล

ไฮดรอกซิล ($\text{OH}\cdot$) เป็นหลัก ซึ่งซูเปอร์ออกไซด์ ($\text{O}_2\cdot^-$) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จะไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอโดยตรง แต่จะทำปฏิกิริยากับธาตุโลหะบางชนิด เช่น ธาตุเหล็ก (Fe) และทองแดง (Cu) ทำให้เกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($\text{OH}\cdot$) เพื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอต่อไป

ROS สามารถก่อความเสียหายแก่ DNA ได้ในหลายรูปแบบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของเบสทั้งหมดหรือการทำลายเบสในบางจุด เช่น การสูญหายของเบส (Deletion) ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนตามลำดับโคดอน (Codon) เปลี่ยนแปลงไป (Frameshift) หรือเกิดการแตกหักของพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ระหว่างดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (strand break) หรืออาจทำให้เกิด DNA protein cross-links ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของโปรตีนที่เชื่อมระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีนฮิส-โตน (Histone) ทำให้ดีเอ็นเอแยกตัวออกจากโครงสร้างดังกล่าวของโครโมโซม (Chromosome) นอกจากนี้ อนุมูลอิสระยังมีส่วนทำให้เกิดการเรียงตัวและจับคู่ใหม่ของโครโมโซม (Chromosomal rearrangement) และการแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติด (Sister chromatid) (Ray et al., 2000) ซึ่งทั้งหมดนี้จะทำให้การแสดงออกของยีน (Gene expression) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางลบ โดยเฉพาะหากเกิดการเปลี่ยนแปลงในบริเวณที่เป็น Promoter หรือ Enhancer ซึ่งจะทำให้ยีนในบริเวณข้างเคียงไม่มีการแสดงออก เช่น การเปลี่ยนแปลงของ Tumor suppressor gene ซึ่งจะนำไปสู่จุดเริ่มต้นของการเกิดโรคมะเร็ง

โดยทั่วไปปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ มักจะเกิดขึ้นในบริเวณที่มีเบสกวานีน (Guanine: G) และไซโตซีน (Cytosine: C) ทำให้เกิดเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเกิดมะเร็ง (Ray et al., 2000)

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในกระบวนการชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (Cardiovascular disease) โรคเบาหวาน (Diabetes) โรคมะเร็ง (Cancer) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) อาการอักเสบ (Inflammatory) อาการผื่นคันที่ไม่ทราบสาเหตุ (Atopic eczema) โรคไขข้ออักเสบ (Rheumatism) และต้อกระจก (Cataract) (อัญชญา เจนวิถีสุข, 2544) เป็นต้น ตลอดจนเป็นปัญหาหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจาก อนุมูลอิสระก่อให้เกิดการเหม็นหืน (Rancid) ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้อายุการเก็บรักษาน้อยลง

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเหล่านั้น สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ที่มีความสามารถจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความเสถียรมากกว่าเดิม ส่งผลทำให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ได้ (Denisov & Afanas'ev, 2005) ซึ่งมีรายงานว่า สารที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสามารถหาได้จากธรรมชาติ และพบมากในพืชผักและผลไม้ รวมทั้งธัญพืช ชา สมุนไพร (Diplock et al., 1998)

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) คือ สารที่สามารถป้องกัน หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ตักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies et al., 1992) สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ (Chattopadhyay & Chattopadhyay, 2008) โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) (Velioglu et al., 1998) บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร

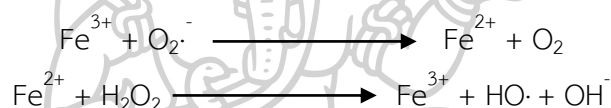
อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล ซึ่งสารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่างๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมากๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง และส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือเบต้าแคโรทีน (β -carotenoid) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น

2.4 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

2.4.1 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจากร่างกาย (Antioxidant enzymes)

2.4.1.1 Superoxide dismutases (SODs) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ Superoxide ให้เปลี่ยนเป็น H_2O_2 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะพบในเซลล์ทุกเซลล์และพบใน Extracellular fluid SODs นั้นจะมี Cofactor เป็นโลหะหนักซึ่งได้แก่ Cu, Zn และ Mn ในมนุษย์ Cu/Zn-SODs จะพบใน Cytoplasm ส่วน Mn-SODs จะพบใน Mitochondria จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ของ SODs ยังคงเป็น ROS ซึ่งในสภาวะปกติจะมีเอนไซม์ Catalases และ Peroxidases เข้ามาเปลี่ยนโมเลกุลของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและ O_2 ต่อไป อย่างไรก็ตาม หากร่างกายเกิดภาวะขาดเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดข้างต้นจะทำให้เกิดภาวะ Oxidative stress และเสี่ยงต่อการเกิด Fenton reaction ซึ่งจะเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็น Hydroxyl radical ซึ่งเป็น Oxidizing agent ที่รุนแรงได้ (Choe & Min, 2009; Nimse & Pal, 2015) ดังสมการ



2.4.1.2 Catalases เป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและ O_2 โดยใช้ Substrate เป็น H_2O_2 จำนวน 2 โมเลกุล เอนไซม์ชนิดนี้มี Mn หรือ Fe เป็น Cofactor ซึ่งจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ใน Eukaryotic cell ทั่วไป (Nimse & Pal, 2015)

2.4.1.3 Glutathione peroxidases ซึ่งจะช่วยเร่งปฏิกิริยา Reduction ของ Hydrogen peroxide ซึ่งจะเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ (Nimse & Pal, 2015)

2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants)

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้มากในพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (Non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) เช่น แซนโธน (Xanthone) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (Aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (Functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H\cdot$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้ สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ Ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH\cdot$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับ

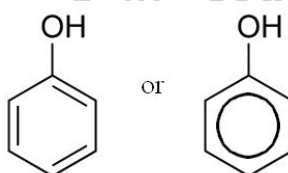
โลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) (Sanchez-Moreno et al., 2000) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาติมานานานชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) และในสิ่งมีชีวิต *lin vivo*)

ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโดยสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันออกไป ตามคุณสมบัติของสารนั้นๆ เช่น คุณสมบัติการละลายในน้ำหรือไขมัน (Le Prell et al., 2007) ดังตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ต่อไปนี้

1.) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound)

สารประกอบฟีนอลิกคือกลุ่มของสารที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 1 หมู่ หรือมากกว่าต่ออยู่กับวงแหวนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (เบนซีน) ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยโครงสร้างพื้นฐานของสารฟีนอลิกแสดงดังภาพที่ 2

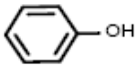
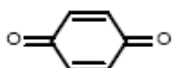
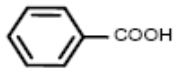
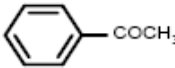
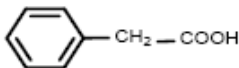
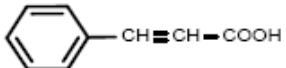
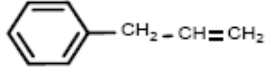
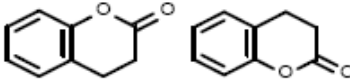
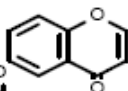
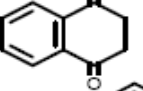
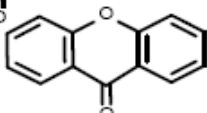
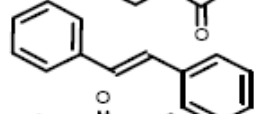
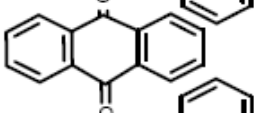
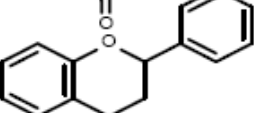


ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

ที่มา: (Vermerris & Nicholson, 2006)

โครงสร้างพื้นฐานของสารฟีนอลิกจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไป รวมกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) ก็ได้ แต่น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกคือ กลูโคส (Glucose) นอกจากนี้ ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) กรดอินทรีย์ (Organic acid) เอมีน (Amine) และไขมันอีกด้วย

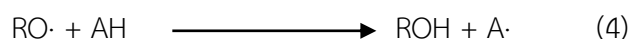
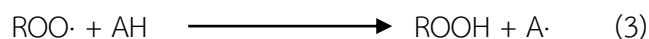
ตารางที่ 3 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มต่างๆ

Class	Basic Skeleton	Basic Structure
Simple phenols	C ₆	
Benzoquinones	C ₆	
Phenolic acids	C ₆ -C ₁	
Acetophenones	C ₆ -C ₂	
Phenylacetic acids	C ₆ -C ₂	
Hydroxycinnamic acids	C ₆ -C ₃	
Phenylpropenes	C ₆ -C ₃	
Coumarins, isocoumarins	C ₆ -C ₃	
Chromones	C ₆ -C ₃	
Naftoquinones	C ₆ -C ₄	
Xanthenes	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Stilbenes	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Anthraquinones	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonoids	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Lignans, neolignans	(C ₆ -C ₃) ₂	
Lignins	(C ₆ -C ₃) _n	

ที่มา: (Bravo, 1998)

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (AH) ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 3 และ 4

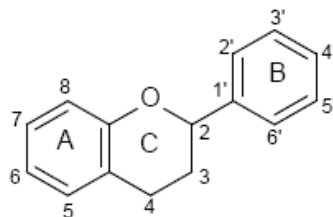


เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีความเสถียร เนื่องจากเกิดการเคลื่อนย้ายของอิเล็กตรอนในวงแหวนเบนซีน และทำให้ไม่มีตำแหน่งที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของโมเลกุลออกซิเจน (Shahidi & Naczki, 2004) นอกจากนี้ อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย ดังสมการที่ 5 และ 6



โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกนั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่ง และหมู่แทนที่บนวงแหวนเบนซีน เช่น การมีหมู่ไฮดรอกซิลลำดับที่ 2 ที่ตำแหน่งออร์โท (Ortho-) และพารา (Para-) ของสารประกอบฟีนอลิก จะไปเพิ่มสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยการแทนที่ตรงตำแหน่งของออร์โท และพารา หมายถึง หมู่แทนที่ทั้งสองหมู่นั้นอยู่ที่ตำแหน่ง 1,2- และ 1,4- ของกันและกันในวงแหวนเบนซีน ตามลำดับ นอกจากนี้ การแทนที่ของหมู่แอลคิลที่ตำแหน่งออร์โท และพารา ก็มีผลต่อการเพิ่มสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน (Shahidi & Naczki, 2004) โดยสารประกอบที่สำคัญและพบมากที่สุดในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) สารฟลาโวนอยด์พบได้ทั่วไปในทุกส่วนของพืชสีเขียว จัดเป็นสารสำคัญในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาเวอน (Flavan) ประกอบด้วยวงแหวน 2 วงที่เชื่อมต่อกันด้วยคาร์บอนสามอะตอม ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) และมีการระบุตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในภาพที่ 3 โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4



ภาพที่ 3 โครงสร้างพื้นฐานของสารฟลาโวนอยด์

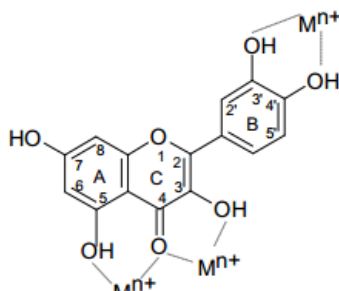
ที่มา: (Bravo, 1998)

ตารางที่ 4 โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มต่างๆ

Flavonoid	Basic Structure
Anthocyanidin	
Aurones	
Biflavonoids	
Chalcones	
Dihydrochalcones	
Dihydroflavonol	
Flavandiols or leucoanthocyanidin	
Flavanol	
Flavanones	
Flavones	
Flavonols	
Isoflavonoids	
Proanthocyanidins or condensed tannins	

ที่มา: (Bravo, 1998)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ทำหน้าที่เป็น Chelating agent ดักจับไอออนของโลหะเอาไว้ในโมเลกุล เช่น เควอร์ซีทิน (Quercetin) โดยโครงสร้างมีตำแหน่ง (Binding site) ที่สามารถดักจับไอออนของโลหะ เช่น ทองแดง ได้ 3 บริเวณ คือ บริเวณ 3',4'-dihydroxy ของวงแหวน B บริเวณ 3-hydroxyl, 4-keto ของวงแหวน C และบริเวณระหว่างตำแหน่ง 5-hydroxyl ของวงแหวน A กับตำแหน่ง 4-keto ของวงแหวน C (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ตำแหน่งการดักจับไอออนโลหะของฟลาโวนอยด์
ที่มา: (Pietta, 2000)

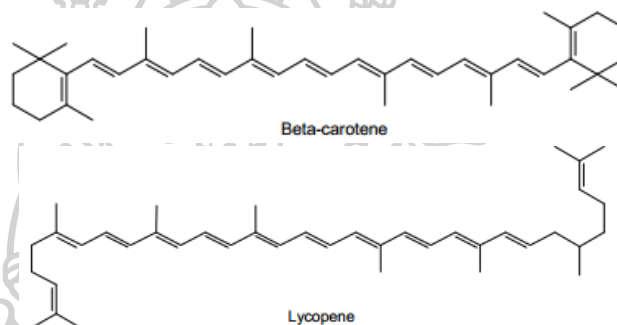
ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับทั่วไปในวงการแพทย์ว่า การบริโภคอาหารที่อุดมด้วยสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผักและผลไม้ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งมีการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดของโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง ระบบทางเดินอาหาร โรคทางระบบประสาท โรคตับหลอดเลือด โรคอ้วน และโรคภูมิแพ้ มีอัตราการเกิดโรคที่ลดลง (Han et al., 2007; Manach et al., 2005; Pan et al., 2008) ทั้งนี้ คุณสมบัติดังกล่าวนี้จึงมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

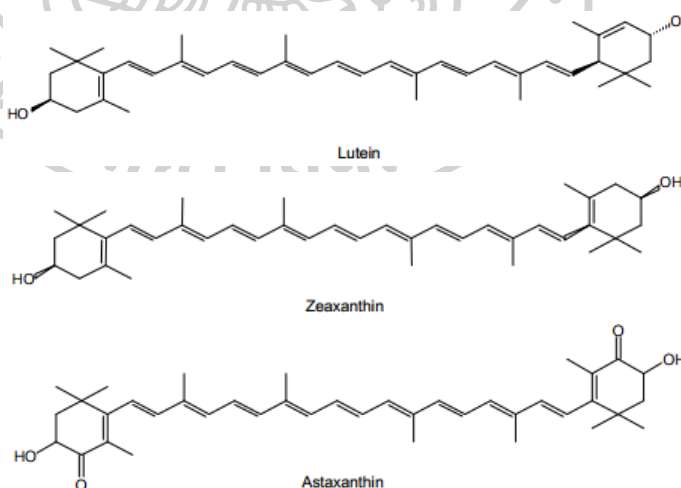
แคโรทีนอยด์เป็นสารสีที่พบมากในพืชและสัตว์ มีทั้งสีเหลือง ส้มและแดง เป็นสารสีที่ละลายได้ในไขมัน แคโรทีนอยด์มีมากกว่า 600 ชนิด มีอยู่ชนิดที่พบได้บ่อย คือ แอลฟา-แคโรทีน (Alpha-carotene) บีตา-คริปโตแซนทิน (Beta-cryptoxanthin) ลูทีน (Lutein) ซีแซนทิน (Zeaxanthin) บีตา-แคโรทีน (Beta-carotene) และไลโคพีน (Lycopene)

โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (Isoprene unit) จำนวน 8 หน่วย ที่เกิดพันธะโควาเลนกัน และทำให้เกิดคอนจูเกชันของพันธะคู่เป็นสายยาว (Extensive conjugated double bond) ซึ่งระบบคอนจูเกชันนี้เองที่ทำให้แคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนพลังงานแสงอัลตราไวโอเล็ตและแสงสีขาวย ทำให้แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสีและมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

โมเลกุลของแคโรทีนอยด์อาจเป็นเส้นตรง ดังที่พบในไลโคพีน (Lycopene) หรือเป็นวงแหวน (ring) ที่ปลายโซ่ของโมเลกุล ดังที่พบในเบต้า-แคโรทีน สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์เป็น 2 กลุ่ม คือ Hydrogenated และ Oxygenated carotenoid derivatives โดยกลุ่มแรกคือ Hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (Carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบไปด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน และไลโคพีน เป็นต้น (ภาพที่ 5) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่ม Oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิล (Xanthophyll) นั้นมีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่าแคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ลูทีน ซีแซนทิน และแอสตาแซนทิน เป็นต้น (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Hydrogenated carotenoid derivatives ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (บน) และไลโคพีน (ล่าง)

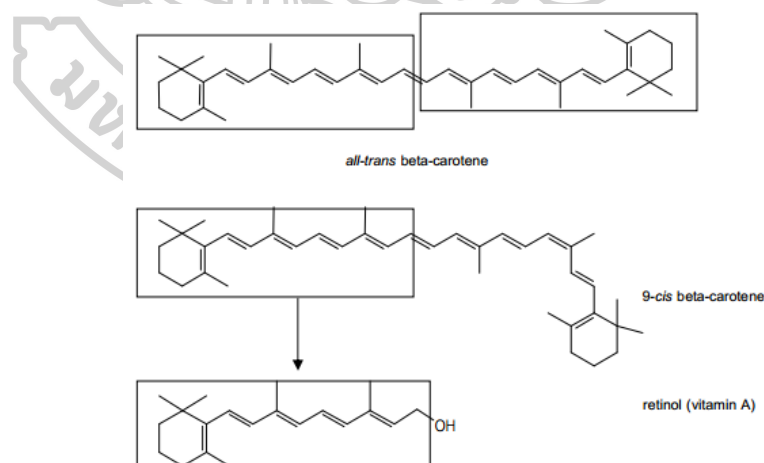


ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ Oxygenated carotenoid derivatives ได้แก่ ลูทีน (บน) ซีแซนทิน (กลาง) และแอสตาแซนทิน (ล่าง) ตามลำดับ

เบต้า-แคโรทีนยังใช้ในการรักษาโรคบางชนิด เช่น โรคมะเร็ง ความผิดปกติของผิวหนังอันเนื่องมาจากความไวต่อแสง ซึ่งการที่ผิวหนังมีความไวต่อแสงจะกระตุ้นให้มีการสร้างพอร์ไฟริน (Porphyrins) ที่ผิวหนังซึ่งจะดูดกลืนพลังงานจากแสงและทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำลายเซลล์และทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ การได้รับเบต้า-แคโรทีนจะทำให้อาการเจ็บปวดลดลง เนื่องจากเบต้า-แคโรทีนไปหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ โดยใช้กลไกทางฟิสิกส์โดยอนุมูลอิสระที่มีพลังงานสูง (Singlet state, $^1O_2^*$) ถ่ายเทพลังงานให้กับเบต้า-แคโรทีน ซึ่งมีอิเล็กตรอนในโครงสร้างสูงและสามารถดูดกลืนพลังงานได้ดี ผลิตภัณฑ์ของออกซิเจนที่มีพลังงานต่ำลง (Triplet state, 3O_2) และเบต้า-แคโรทีนพลังงานสูง (Triplet state, $^3Car^*$) จากนั้นเบต้า-แคโรทีนคายพลังงานออกมาในรูปความร้อน จะเห็นว่าในการทำการหยุดยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระโครงสร้างของเบต้า-แคโรทีนไม่มีการเปลี่ยนแปลง เพราะใช้กลไกทางฟิสิกส์ ไม่ใช่กลไกทางเคมี โดยการยับยั้งการทำงานของซิงเกิลออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, $^1O_2^*$)

ไลโคพีนสามารถยับยั้งออกซิเจนพลังงานสูง (Singlet state, $^1O_2^*$) ได้มากที่สุดในบรรดาสารกลุ่มแคโรทีนชนิดด้วยกัน เพราะมีพันธะคู่เรียงสลับกับพันธะเดี่ยว (conjugate) ในโครงสร้างทางเคมีมากถึง 11 คู่ และยังมีพันธะคู่ที่ไม่ใช่ Conjugate อีก 2 คู่ (Perretti et al., 2013) ซึ่งแสดงถึงการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง

เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) เมื่อเข้าสู่เซลล์ (*In vivo*) จะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ โดยการแตกหักของพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางโมเลกุล (ภาพที่ 7)

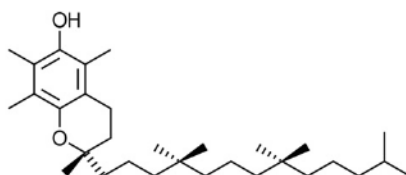


ภาพที่ 7 โครงสร้างของ All-trans beta-carotene, 9-cis beta-carotene และ Retinol (Vitamin A)

3.) วิตามิน (Vitamins)

วิตามินอี (Tocopherols)

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต วิตามินอี (ภาพที่ 8) จะปรากฏเป็นสารประเภทไขมัน (Le Prell et al., 2007) แบ่งย่อยได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ α -tocopherol, β -tocopherol, ρ -tocopherol และ δ -tocopherol ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมธิลที่ติดอยู่กับ Chromane ring (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2544)



ภาพที่ 8 โครงสร้างพื้นฐานของวิตามินอี
ที่มา: (Oroian & Escriche, 2015)

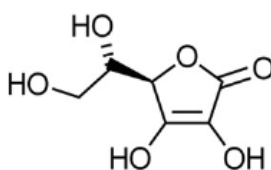
วิตามินอีมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่ให้อิเล็กตรอน (Electron donor) ซึ่งจะทำปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) กับอนุมูลเพอร์ออกซิล (Peroxyl radical) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในขั้นตอนพروبพาเกชัน (Propagation step) (Le Prell et al., 2007) ดังสมการที่ 7 และ 8



จากสมการจะเห็นว่า เมื่อ α -tocopherol ทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกซิลแล้ว จากนั้นจะเกิดอนุมูล α -tocopherol ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกซิลโมเลกุลอื่น และได้เป็นสารที่มีความเสถียร และหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันลง (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2544)

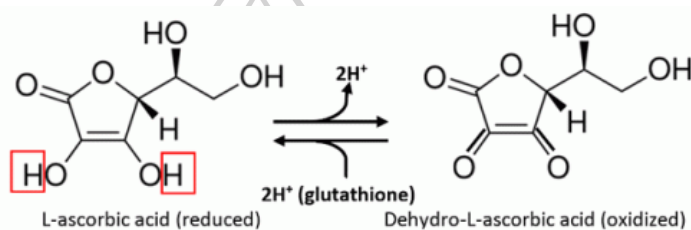
วิตามินซี (Ascorbic acid)

วิตามินซีสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยารีดักชัน ซึ่งปฏิกิริยาของวิตามินซีจะเกิดขึ้นภายในบริเวณของเซลล์ที่ประกอบไปด้วยน้ำ (Aqueous phase) ซึ่งต่างกับปฏิกิริยาที่เกิดจากวิตามินอีซึ่งเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ (Le Prell et al., 2007)



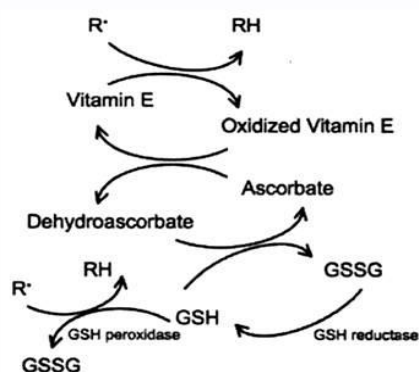
ภาพที่ 9 โครงสร้างพื้นฐานของวิตามินซี
ที่มา: (Oroian & Escriche, 2015)

วิตามินซีในอาหารมี 2 รูปแบบซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทั้ง 2 ชนิด คือ Ascorbic acid และ Dehydroascorbic acid ซึ่ง Ascorbic acid มีลักษณะโมเลกุลคล้ายกับน้ำตาลกลูโคส มีผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว วิตามินซีเมื่อถูกออกซิไดซ์จะกลายเป็น Dehydroascorbic acid ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาทางเคมีในร่างกาย วิตามินซีร่วมในปฏิกิริยา Oxidation reduction และปฏิกิริยาในการขนส่งอนุมูล Hydrogen ดังแสดงในภาพที่ 10 ด้วยเหตุนี้วิตามินซีจึงเป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยา Reduction Agent หรือ Antioxidant ที่มีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปฏิกิริยาการเผาผลาญไขมันและสามารถป้องกันไม่ให้เกิด Oxidation ของ Tetrahydrofolate ซึ่งเป็นโฟเลท โคอเอนไซม์ทำให้มีการดูดซึมเหล็กในรูปแบบที่เป็น Non-heme ในลำไส้ให้มากขึ้น



ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของวิตามินซี

วิตามินซี มีบทบาทในการเข้ามาช่วยรีดิวซ์วิตามินอีให้กลับมาอยู่ในรูปเดิม โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับวิตามินอี ซึ่งส่งผลให้วิตามินอีกลับมามีประสิทธิภาพในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่อีกครั้ง Ascorbic acid ที่ผ่านการรีดิวซ์จะกลายเป็น Dehydroascorbic acid ที่ไม่พร้อมทำงาน จากนั้น Glutathione ในร่างกายจะทำหน้าที่รีดิวซ์ Dehydroascorbic acid ให้กลับไปเป็น Ascorbic acid ที่พร้อมทำงานเช่นเดิม (Lauren, 2008) ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างวิตามินอี วิตามินซีและกลูตาไทโอน

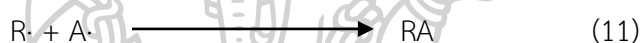
ที่มา: (Lauren, 2008)

วิตามินซีสลายตัวได้เร็วที่สุดในจำพวกวิตามินด้วยกัน และมีความไวต่อปฏิกิริยา Oxidation โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวต่อออกซิเจนมาก

2.5 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

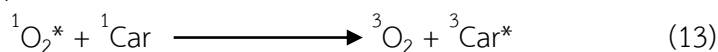
จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีหลายกลไกดังนี้
ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging)

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Valacchi, 2004) ดังสมการที่ 9, 10, 11 และ 12 โดยที่สารต้านอนุมูลอิสระ (AH) จะให้ไฮโดรเจนอนุมูลอิสระ (R·) ทำให้โมเลกุลมีสมดุค (9 และ 10) และสารต้านอนุมูลอิสระที่สูญเสียไฮโดรเจนไป (A·) ยังสามารถเข้าจับกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลได้ด้วย (11 และ 12)



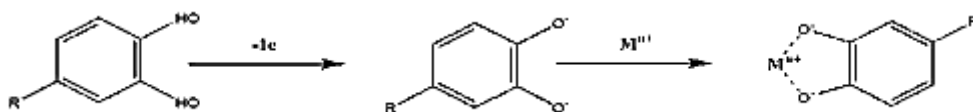
ยับยั้งการทำงานของซิงเกิ้ลท์ออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, $^1O_2^*$)

โดยปกติออกซิเจนที่อยู่ในสถานะพื้น (Ground state) จะอยู่ในรูปของรูปทริปเปรีท (Triplet oxygen, 3O_2) จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกรดไขมัน แต่เมื่อ Triplet oxygen ได้รับพลังงานกระตุ้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของซิงเกิ้ลท์ออกซิเจน (Singlet oxygen, $^1O_2^*$) ซึ่งจะไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกิ้ลท์ออกซิเจน โดยการเปลี่ยน ($^1O_2^*$) ให้อยู่ในรูปทริปเปรีท (Triplet oxygen, 3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) จำนวน 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกิ้ลท์ออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies et al., 1992)



จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal chelation)

โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Sanchez-Moreno et al., 2000) โดยสารที่ทำหน้าที่จับกับโลหะเหล่านี้ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และกรดซิตริก (Citric acid) เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (Enzyme inhibition)

สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และ แกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็ก ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Puerta, 1999)

การสลายเปอร์ออกไซด์ (Peroxide decomposing)

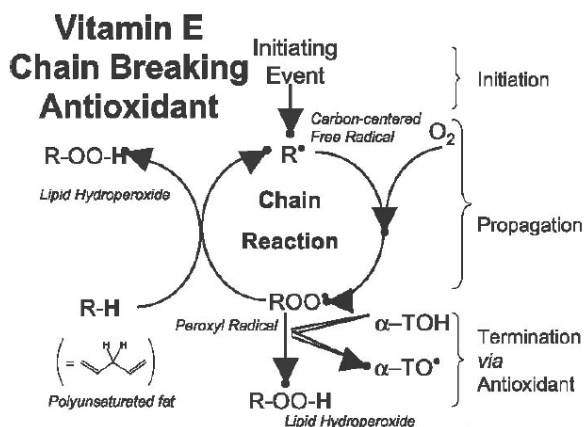
สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด หรือกรดไฮโปไฟรฟีนิก สามารถทำหน้าที่สลายเปอร์ออกไซด์ของไขมัน ให้เกิดเป็นสารที่มีความเสถียร เช่น แอลกอฮอล์ คีโตน หรือ แอลดีไฮด์

ดักจับออกซิเจน (Oxygen scavenging)

วิตามินซี (ascorbic acid) มีสมบัติในการจับกับออกซิเจน สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับซูเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเพอร์ออกซิล และ singlet oxygen (Gordon, 2001) วิตามินซีทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ซึ่ง (Reducing agent) ซึ่งจะให้ไฮโดรเจนอะตอม (H) ให้กับออกซิเจน จึงทำให้ออกซิเจนไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ นอกจากนี้ วิตามินซียังทำหน้าที่เป็นตัวเสริมฤทธิ์ (synergism) ซึ่งจะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α -tocopherol) กับวิตามินซี โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) ได้เหมือนกับวิตามินอี แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟา-โทโคฟีรอลเปอร์ออกซิล (α -tocopherol peroxy) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลฟา-โทโคฟีรอล กับอนุมูลเปอร์ออกซิล ($\text{ROO}\cdot$) เพื่อเปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟา-โทโคฟีรอล ที่สามารถทำงานได้ (Frankel et al., 1998)

หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

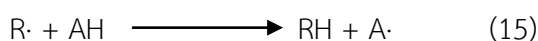
วิตามินอี (α -tocopherol; Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxy ($\text{ROO}\cdot$) (Burton & Traber, 1990) ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน
ที่มา: (Burton & Traber, 1990)

2.6 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ 15 และ 16



เมื่อ R· และ RO· คือ อนุมูลอิสระ, AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมี การป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระ โดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไป จำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวนี้ได้มาจากพืชผักและผลไม้ (บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์, 2556)

มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นอาหารที่มีประโยชน์และเป็นพืชที่ใช้บำบัดโรคของอินเดีย แต่เดิมถูกนำมาใช้มากกว่าศตวรรษ พบว่ามีการนำมาปลูกอย่างกว้างขวางทั่วทั้งภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งโซนร้อน ทุกส่วนของพืชและส่วนประกอบต่างๆ ถูกนำมาใช้ในการแพทย์แผนโบราณสำหรับการรักษาโรคภัยไข้เจ็บ มะม่วงหาวมะนาวโห่จัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรนี้จะมีอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน สารประกอบฟีนอลิก และแทนนิน (Singh & Uppal, 2015) ซึ่งในปี ค.ศ. 2015 Sarma และคณะ ได้ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติโภชนเภสัช (nutraceutical property) ของมะม่วงหาวมะนาวโห่ พบว่า มะม่วงหาวมะนาวโห่แสดงค่าโภชนเภสัชที่สูง โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ $188.75 \pm 1.42 \mu\text{g GAE/g}$ ปริมาณวิตามินซีเท่ากับ $62.93 \pm 0.35 \text{ mg/100 g}$ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ $19.32 \pm 0.69 \text{ mg/100 g}$ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ $0.185 \pm 0.011 \mu\text{g/g}$ ปริมาณสารเยื่อใยเท่ากับ $15.64 \pm 0.64\%$ และมีค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (IC_{50}) เท่ากับ $27.45 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$ การศึกษานี้แสดงให้เห็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระของมะม่วงหาวมะนาวโห่ นั่นคือ วิตามินซี และสารประกอบฟีนอลิก และนอกจากนี้มะม่วงหาวมะนาวโห่ยังอุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกากใย (Sarma et al., 2015) ทั้งนี้ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นแหล่งสำคัญของธาตุเหล็ก มีปริมาณแคลเซียมซึ่งเป็นโยอาหารที่ละลายน้ำได้ในปริมาณสูง และยังอุดมไปด้วยสารแอนโทไซยานิน โดยสารแอนโทไซยานินที่พบในมะม่วงหาวมะนาวโห่ปริมาณมากคือ cyanidin-3-O-rhamnoside, pelargonidin-3-O-glucoside และ cyanidin-3-O-glucoside ซึ่งเป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางว่ามีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Kamlesh et al., 2010) ในปี ค.ศ. 2013 Sueprasarn และคณะ ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอนโทไซยานินจากผลหนามแดง โดยเลือกกระยะการสุกของผลหนามแดงเป็นผลสุกเต็มที่ที่มีสีม่วงเข้ม ($L^* a^* b^*$ ที่ 13.86 24.78 และ 9.74 ตามลำดับ) พบว่า สารสกัดหนามแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายไฮโดรคลอริก 1% ในเอทานอล 95% โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อวัตถุดิบเป็น 20:1 โดยน้ำหนัก (g) ต่อปริมาตร (mL) นาน 120 นาที ให้ค่า pH เท่ากับ 0.91 มีความสว่างเท่ากับ 54.37 ค่าสีแดงเท่ากับ 75.48 ค่าสีเหลืองเท่ากับ 2.61 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คือ 1,533.70 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 444.29 มิลลิกรัมของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (Sueprasarn et al., 2013) ส่วนของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีสรรพคุณมากมายนั้นจะให้ปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่างกับ ขึ้นอยู่กับระยะความสุกที่แตกต่างกัน ซึ่งได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับระยะความสุกของผลไม้ที่ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน ในปี ค.ศ. 2010 Oliveira และคณะ ได้ศึกษาผลของระยะการสุกในสตรอว์เบอร์รี่ที่มีต่อองค์ประกอบทางเคมีและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ปริมาณฟีนอลิก (TPC) มีค่าที่สูงใน

ระยะเวลาผลดิบ (unripe) และผลห่าม (intermediate) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 108 และ 111 mg GAES/g dry fruit ตามลำดับ และมีค่า 60 mg/g dry fruit ที่ระยะผลสุก (ripe) ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ระยะผลสุกแสดงค่า EC_{50} ที่น้อยที่สุด (0.25 ± 0.02 mg/mL) และผลห่ามแสดงค่า EC_{50} ที่น้อยที่สุดในวิธี Reducing power ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.09 ± 0.05 mg/mL จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับระยะเวลาสุกของผลไม้ (Oliveira et al., 2011) ในปี ค.ศ. 2011 Tlili และคณะ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่อสายพันธุ์และระยะเวลาสุกที่แตกต่างกันของแตงโม โดยตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณ total vitamin C, phenol, flavonoid, lycopene และ β -carotene contents พบว่า ระยะเวลาสุกมีอิทธิพลต่อปริมาณสารพฤกษเคมี โดยแตงโมระยะผลสุก สายพันธุ์ P503 แสดงปริมาณ lycopene ที่สูงที่สุด (64.5 mg kg^{-1} fw) ในขณะที่สายพันธุ์ Dumara แสดงปริมาณ β -carotene สูงที่สุด (2.1 mg kg^{-1} fw) ส่วนสายพันธุ์ Giza แสดงปริมาณสารพฤกษเคมีที่สูง ได้แก่ total phenol (260.1 mg GAE kg^{-1} fw), flavonoid (260.0 mg RE kg^{-1} fw) และ total vitamin C (204.0 mg kg^{-1} fw) ข้อมูลเหล่านี้พิสูจน์ให้เห็นว่า สายพันธุ์และระยะเวลาสุกของแตงโมมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Tlili et al., 2011) และในปี ค.ศ. 2012 Amira และคณะ ศึกษาผลของระยะเวลาสุกของผลอินทผลัมที่มีต่อสารฟีนอลิก องค์ประกอบสารพฤกษเคมี และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาพบว่า ในระยะที่ผลโตเต็มที่ (besser) จะให้ปริมาณฟีนอลิก (TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (TFC) ปริมาณแทนนิน (CTC) ที่สูงกว่า ระยะผลสุกมีเนื้อนิ่ม (rutab) กับระยะผลแห้ง (tamr) และยังมีการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดด้วย (Amira et al., 2012) ปี ค.ศ. 2013 Fawole และคณะ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และการต้านอนุมูลอิสระของทับทิมที่มีระยะเวลาสุก 5 ระยะ โดยผลการทดสอบพบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ปริมาณน้ำตาลและปริมาณแอนโทไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาสุกอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในขณะเดียวกันปริมาณกรด (TA) และปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์มีปริมาณลดลงตามระยะเวลาสุกอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งค่าการต้านอนุมูลอิสระของทับทิมลดลงตามระยะเวลาสุกอย่างมีนัยสำคัญด้วย (วิเคราะห์ด้วย DPPH และ FRAP assay) (Fawole & Opara, 2013) เมื่อไม่นานมานี้ ปี ค.ศ. 2016 Almeida และคณะ ประเมินสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของพุทราทะเล ได้แก่ องค์ประกอบเคมีกายภาพ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของผลดิบ และผลสุก พบว่า ที่ระยะเวลาสุกของผลไม้ที่ต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Almeida et al., 2016) งานวิจัยเหล่านี้สามารถบอกถึงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดที่จะเข้าถึงศักยภาพสูงสุดของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบผลไม้ชนิดๆ ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 มะม่วงหาวมะนาวโห่

จากตลาดผลไม้ จ.นครปฐม เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558

3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 *Escherichia coli*

3.2.2 *Staphylococcus aureus*

3.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.4 *Salmonella typhimurium*


3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1	Acetic acid (CH_3COOH)	Merck
3.3.2	Agar	Lab M Limited
3.3.3	Agarose	Theetra Trading
3.3.4	Aluminium chloride Hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich
3.3.5	Ascorbic acid	Sigma Aldrich
3.3.6	Beef extract	Lab M Limited
3.3.7	Bromophenol blue	Fluka
3.3.8	Deionized water (DI)	
3.3.9	Diclofenac sodium salt	Sigma Aldrich
3.3.10	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma Aldrich
3.3.11	Disodium phosphate (Na_2HPO_4)	Ajax Finechem
3.3.12	Distilled water	
3.3.13	Egg albumin	
3.3.14	Folin-Ciocalteu reagent	Sigma Aldrich
3.3.15	Gallic acid	Fluka
3.3.16	Glycerol	Amresco
3.3.17	Hydrochloric acid (HCl)	RIC Labscan Limited

3.3.18	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Merck
3.3.19	Iron (III) chloride Hexahydrate (FeCl ₃ .6H ₂ O)	Fluka
3.3.20	L-DOPA	Sigma Aldrich
3.3.21	Methanol	RIC Labscan Limited
3.3.22	Metaphosphoric acid	EMSURE
3.3.23	Monopotassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	RIC Labscan
3.3.24	Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	Ajax Finechem
3.3.25	Mushroom tyrosinase	Sigma Aldrich
3.3.26	Peptone	Lab M Limited
3.3.27	Phenol solution	RIC Labscan Limited
3.3.28	Plasmid DNA (pBR322)	Thermo scientific
3.3.29	Potassium Chloride (KCl)	Fluka
3.3.30	Rutin hydrate	Sigma Aldrich
3.3.31	Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	RIC Labscan Limited
3.3.32	Sodium hydroxide (NaOH)	RIC Labscan Limited
3.3.33	Sodium nitrite (NaNO ₂)	Merck
3.3.34	Sulfuric acid	RIC Labscan Limited
3.3.35	2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	Sigma Aldrich
3.3.36	XAD-7 column	Sigma Aldrich

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1	Analytical Balances	Sartorius
3.4.2	Autoclave	Tomy model SX-700
3.4.3	Autopipette & Tips	Biohitt, Scilogex
3.4.4	Beaker	Duran
3.4.5	Centrifuge tube	Bioline
3.4.6	Colorimeter	Gardner
3.4.7	Cuvette	Starna scientific
3.4.8	Cylinder	Pyrex
3.4.9	Dessicator	Tarson
3.4.10	Dropper	



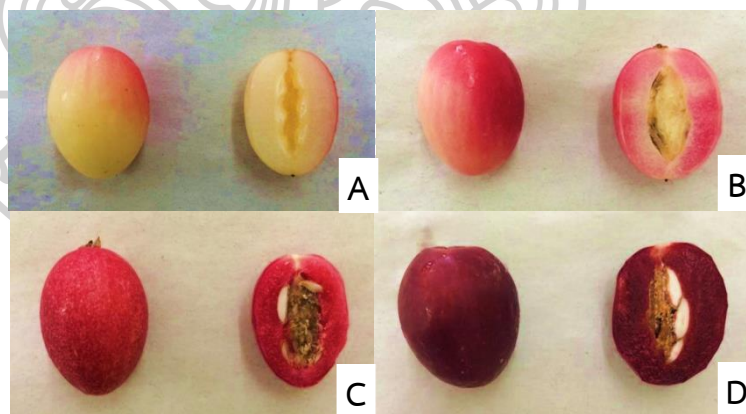
3.4.11	Disc paper	Whatman
3.4.12	Eppendorf	Tarson
3.4.13	Erlenmeyer flask	Duran
3.4.14	Electrophoresis	Major science
3.4.15	Filter paper	Whatman
3.4.16	Freeze Dryer	SCANVAC
3.4.17	Hand refractometer	ATAGO
3.4.18	HPLC	Shimadzu
3.4.19	Incubator	Mammert
3.4.20	Juice extractor	Shape
3.4.21	Magnetic stirrer	
3.4.22	Microcentrifuge	Hettich zentifugal
3.4.23	Microcentrifuge tube	
3.4.24	Mortar	
3.4.25	pH meter	SUNTEX
3.4.26	Pipette	Thermo Scientific
3.4.27	Rotary evaporator	IKA RV8
3.4.28	Shaker	New Brunswick
3.4.29	Spatula	
3.4.30	Sonicate bath	Branson
3.4.31	Spectrophotometer	Biochrom Libra 22
3.4.32	Test tube	Pyrex
3.4.33	Volumetric flask	JSGW
3.4.34	Vortex Mixer	SCILOGEX MX-5
3.4.35	Water Bath	Jolabo
3.4.36	96 well plates Microplate reader	TECAN

3.5 ระเบียบวิธีวิจัย

3.5.1 ตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมี-กายภาพ

3.5.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ซื้อมาจากตลาดผลไม้ จ.นครปฐม เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ล้างให้สะอาด แบ่งตามระยะการสุกเป็น 4 ระยะ ทำการวัดขนาดของผลจากตัวอย่าง 30 ผล (ความกว้าง ความยาว) โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งและทำการบันทึก คัดขนาดผลแต่ละระยะให้มีขนาดใกล้เคียงกัน คือ 1. ผลดิบ เปลือกมีสีขาวเหลืองอ่อนปนชมพู (สีชมพูน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10% ของพื้นที่ผิวทั้งหมด) เนื้อมีสีขาวเหลืองอ่อน 2. ผลห่าม เปลือกมีสีชมพูอ่อนๆ และเริ่มมีสีแดง เนื้อมีสีชมพู 3. ผลแก่ เปลือกและเนื้อมีสีแดงทั่วทั้งผล 4. ผลสุก เปลือกและเนื้อมีสีแดงดำ ดังแสดงในภาพที่ 14 หลังจากนั้นนำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้ง 4 ระยะมาผ่าเอาเมล็ดออก ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นผลไม้ กรองแยกกาก บันทึกปริมาตรน้ำผลไม้ที่ได้ด้วยกระบอกตวง (Juice yield) และเก็บน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ในถุง ziplock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี-กายภาพ ซึ่งได้แก่ ค่าสีในระบบ CIE วัดค่าพีเอช ค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด แอนโทไซยานิน และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 14 ลักษณะทางกายภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีระยะการสุกแตกต่างกัน ได้แก่ ระยะผลดิบ (A), ผลห่าม (B), ผลแก่ (C) และผลสุก (D)

3.5.1.2 ค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) และ pH

นำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่มาวัดค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง hand refractometer (0-32 °Brix) และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.5.1.3 ค่าสีในระบบ CIE

นำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ปั่นละเอียดมาวัดค่าสีในระบบ CIE (L^* , a^* , b^*) ด้วยเครื่องวัดสี Colorimeter ซึ่งค่า L^* บอกค่าความสว่าง ค่า $(-a)$ บ่งบอกความเป็นสีเขียว $(+a)$ บ่งบอกความเป็นสีแดง และค่า $(-b)$ บ่งบอกความเป็นสีน้ำเงิน $(+b)$ บ่งบอกความเป็นสีเหลือง แล้วนำมาคิดค่า Chroma ($C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$) และ hue angle ($H^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$)

3.5.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)

นำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 30 เท่า ปิเปิดสารสกัดที่เจือจางแล้วมา 10 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 mL โดยตัวอย่างที่ได้ไม่มีสี จากนั้นเติม phenolphthalein indicator 2-3 หยด แล้วผสมให้เข้ากัน ไตเตรตตัวอย่างในขวดรูปชมพู่ด้วยสารละลาย 0.1 M NaOH จนถึงจุดยุติเป็นสีชมพูอ่อนๆ หรือวัดค่า pH ได้เท่ากับ 8.2 แล้วบันทึกปริมาตรของ 0.1 M NaOH ที่ใช้ นำไปคำนวณปริมาณกรดทั้งหมด ดังสมการที่ 17

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (\% acidity)} = \frac{\text{ml Base} \times \text{N. Base} \times \text{meq. wt. Acid} \times \text{dilution factor} \times 100}{\text{Vol. sample}} \quad (17)$$

โดย mL Base = ปริมาตรของสารละลาย 0.1 M NaOH ที่ใช้ไตเตรต (mL)

N. Base = ความเข้มข้นของ NaOH (0.1 M)

Vol. Sample = ปริมาตรน้ำคั้นที่ใช้ในการไตเตรต (10 mL)

Milliequivalent weight Citric Acid = 0.064

Dilution factor = 30

3.5.1.5 การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี Phenol-sulfuric (Dubois et al., 1956)

ปิเปิดน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่มาปริมาตร 0.5 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลลงไปปริมาตร 0.5 mL แล้วนำไปผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เติมกรดซัลฟิวริกลงไปปริมาตร 2.5 mL แล้วนำไปผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควัน นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นใส่แทนสารละลายตัวอย่างแล้วทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 20-100 $\mu\text{g/mL}$ แสดงผลในหน่วยของ mg glucose/g fresh weight

3.5.2 การทดสอบปริมาณสารพฤกษเคมี

3.5.2.1 การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Bakar et al., 2009)

นำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ปริมาตร 0.25 mL ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent ที่มีกรดเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 1.25 mL ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการเติม 6% Na_2CO_3 ปริมาตร 1 mL แล้วบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่มีความเข้มข้น 20-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะแสดงผลในหน่วยของ $\mu\text{g GAE}/\text{g fresh weight}$

3.5.2.2 การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Bakar et al., 2009)

นำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ปริมาตร 550 ไมโครลิตร มาทำการเติม 5% NaNO_2 ปริมาตร 30 μL ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติมสารละลาย 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 60 μL ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 200 μL ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วดูดสารละลายผสมที่ได้มา 200 μL ใส่ใน microplate แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายรูติน (Rutin) ที่มีความเข้มข้น 200-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะแสดงผลในหน่วยของ $\mu\text{g RE}/\text{g fresh weight}$

3.5.2.3 การหาปริมาณโมโนเมอร์คแอนโทไซยานิน โดยใช้วิธี pH differential method (Wrolstad et al., 2005)

นำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ปริมาตร 0.2 mL เจือจางด้วย 0.025 M KCl buffer pH 1.0 และ 0.4 M CH_3COONa buffer pH 4.5 ปริมาตร 2.8 mL โดยแยกใส่บัพเฟอร์ที่ต่างกันอย่างละหลอด จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที รอให้ปฏิกิริยาอยู่ในสภาวะสมดุล และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน ดังแสดงในสมการที่ 18 ซึ่งจะแสดงในรูปของ cyanidin-3-glucoside

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (18)$$

ปริมาณโมโนเมอร์คแอนโทไซยานิน (mg/L) = $(A \times \text{MW} \times \text{dilution factor} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$

เมื่อ MW ของ cyanidin-3-glucoside = $449.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\epsilon = 26900 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$

ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจะแสดงผลในหน่วยของไมโครกรัมต่อกรัมผลไม้สด ($\mu\text{g/g}$ fresh weight)

3.5.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

3.5.3.1 กิจกรรมการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH free radical scavenging activity) (Peschel et al., 2006)

เตรียมสารตัวอย่าง โดยการนำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ไป freeze-dry แล้วปรับเป็นความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 4, 8 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 50 μL มาทำการเติม 0.2 mM DPPH ปริมาตร 150 μL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สามารถคำนวณได้โดยใช้สูตร ดังแสดงในสมการที่ 19

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition, \%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (19)$$

เมื่อ

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลองควบคุม (0.2 mM DPPH)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีการเติมสารตัวอย่าง (0.2 mM DPPH และตัวอย่าง)

$A_{\text{sample blank}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (ตัวอย่าง)

โดยค่ากิจกรรมการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH จะแสดงเป็นค่า IC_{50} ซึ่ง IC_{50} คือ ปริมาณสารตัวอย่างที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50% ของปริมาณ DPPH เริ่มต้น ซึ่งค่า IC_{50} ได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยทำการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 0-50 $\mu\text{g/mL}$

3.5.3.2 ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP) (Benzie & Strain, 1996)

นำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ปริมาตร 20 μL ผสมกับสารละลาย FRAP (300 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ, 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ปริมาตร 180 μL ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่มีความเข้มข้น 0.004-0.020 μmol โดยความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์แสดงในหน่วยของ $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ fresh weight

3.5.4 DNA nicking assay (Lee et al., 2002)

ปิเปต pBR322 plasmid DNA ปริมาตร 1 μL ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 mL จากนั้นเติม Fenton's reagent ปริมาตร 6 μL (30 mM H_2O_2 , 50 μM ascorbic acid และ 80 μM FeCl_3) จากนั้นเติมน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลงไป (โดยเตรียมจากน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ผ่านการ freeze-dry แล้ว) ปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 μL ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปปมที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ย้อมสีด้วย ethidium bromide หลังจากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วบันทึกภาพผลการทดลองที่ได้ ทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ด้วยโปรแกรม ImageJ

3.5.5 การทดสอบกิจกรรมต้านการอักเสบ (Ullah et al., 2014)

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย egg albumin (จากไข่ไก่สด โดยเอาเฉพาะไข่ขาวที่ผ่านการ freeze-dry แล้ว) ปริมาตร 0.2 mL ผสมกับ phosphate buffered saline (pH 6.4) ปริมาตร 2.8 mL และเติมสารละลายจากการนำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ไป freeze-dry ทำเป็นความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (100, 200 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ปริมาตร 2 mL สำหรับการทดลองควบคุม (control) จะใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากส่วนผสมเย็นลง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และใช้ Diclofenac sodium เป็น reference drug ที่ความเข้มข้นเดียวกับตัวอย่าง (100, 200 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และนำค่าเฉลี่ยไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของการเสียสภาพของโปรตีน ดังสมการที่ 20

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition, \%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (20)$$

3.5.6 การทดสอบคุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้วิธี Disc diffusion แบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียก่อโรค คือ กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella typhimurium* ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ในการทดลองจะเทียบกับ positive control ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) 3 ชนิด คือ Ampicilin, Chloramphenicol และ Gentamicin และ control ได้แก่ น้ำ DI และ DMSO สารตัวอย่างคือ สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยวิธีการทดลองเป็นดังนี้

3.5.6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียทดสอบมา 1 loop จาก agar slant ใส่ลงในอาหารเหลว (NB) ปริมาตร 5 mL โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการเจือจางให้เชื้อเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 10^6 CFU/mL โดยการวัด O.D. ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.12 เพื่อนำใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.6.2 การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.6.1 ปริมาตร 0.1 mL มา spread plate ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง (NA) ทิ้งไว้ให้อาหารแห้งประมาณ 10 นาที จากนั้นนำ disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ซึ่งหยดสารตัวอย่างความเข้มข้น 50 mg/mL (เตรียมจากการนำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ไป freeze-dry แล้วละลายด้วย DMSO หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI) ปริมาตร 40 μ L ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปวางบนอาหารที่ spread เชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการบันทึกผลโดยวัดบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น บริเวณ disc

3.5.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Momtaz et al., 2008)

เติมสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/mL (ได้จากการนำน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ไป freeze-dry) ซึ่งละลายใน 50 mM phosphate buffer pH 6.5 ลงใน 96-well plate ปริมาตร 70 μ L ผสมกับเอนไซม์ mushroom tyrosinase (333 unit/mL ใน buffer เดียวกัน) ปริมาตร 30 μ L บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 12 mM L-DOPA ปริมาตร 110 μ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ใช้ buffer เป็น control และ kojic acid ที่ความเข้มข้น 200 μ g/mL เป็น positive control และนำค่า O.D. ไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังสมการที่ 21

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition, \%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (21)$$

3.5.8 การหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ HPLC (Kubola et al., 2011)

นำผลสดของมะม่วงหาวมะนาวโห่แต่ละระยะการสุก 10 g บดลงในครก แล้วสกัดด้วยสารละลาย 2% metaphosphoric acid ปริมาตร 50 mL ในขวดชมพู จากนั้นนำไปเขย่าบน shaker ที่ความเร็วรอบ 120 rpm นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองผ่าน filter paper (Whatman No.1) นำตัวอย่างที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

- column: Luna C-18 (Phenomenex) 100^oA (250 x 4.6 mm)
- flow rate: 1.0 mL/min
- injection volume: 20 μ l
- injection time: 40 min
- column oven: 40^oC
- mobile phase: 0.1 M KH₂PO₄ : methanol โดยใช้อัตราส่วน 97:3
- UV detector: 280 nm
- สารละลายมาตรฐาน: L-ascorbic acid

3.5.9 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้ HPLC (Ramirez et al., 2015)

นำมะม่วงหาวมะนาวโห่สดแต่ละระยะการสุกปั่นให้ละเอียด แล้วนำไป Freeze-dry จากนั้นนำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ผ่านการ Freeze-dry จำนวน 10 g ใส่ลงในครกแล้วทำการบดให้ละเอียด จากนั้นเติม n-hexane ปริมาตร 100 mL เพื่อกำจัดไขมันออก (defatted) จำนวน 3 ครั้ง นำส่วนที่เป็นของแข็งที่เหลือจากการกำจัดไขมันมาเติม 0.1% HCl ที่ละลายใน MeOH ปริมาตร 100 mL สกัดในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate bath) ในที่มืด นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 และระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ในที่มืด นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้เติมน้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 20 mL ทำการแพ็คคอลัมน์ XAD-7 column ขนาด 0.75x12.50 cm โดยล้าง column ด้วยน้ำกลั่นก่อน load ตัวอย่างลงไป (ปริมาตร 100 mL) หลังจากนั้นนำสารสกัดที่เตรียมไว้ในปริมาตร 20 mL load ลงใน XAD-7 column และสารประกอบแอนโทไซยานินจะถูกชะออกจาก column ด้วย 0.1% HCl ที่ละลายใน MeOH นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกอีกครั้ง แล้วเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน ใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

- column: Luna C-18 (Phenomenex) 100^oA (250 x 4.6 mm)
- flow rate: 0.5 mL/min
- injection volume: 20 μ l
- injection time: 89 min
- mobile phase: linear gradient
 - solvent A: 0.1% aqueous formic acid
 - solvent B: acetonitrile 0.1% formic acid
- UV detector: 520 nm
- สารละลายมาตรฐาน: cyanidin-3-glucoside

Time	Pump A 0.1% aqueous formic acid	Pump B acetonitrile 0.1% formic acid
0-4 min	90	10
4-29 min	75	25
29-64 min	10	90
64-74 min	90	10
74-89 min	90	10

3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ (Statistical analysis)

นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ยแสดงในรูปของ Mean \pm SD และใช้ One Way ANOVA สำหรับทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม SPSS และการทดสอบของ Duncan หากค่า P<0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ

4.1.1 ลักษณะทางเคมีกายภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

4.1.1.1 คุณลักษณะทางกายภาพ (Physical properties)

เมื่อทำการตัดแยกผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีระยะการสุกที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ระยะ จากนั้นนำมาวัดความยาว (Length, mm) เส้นผ่านศูนย์กลาง (Diameter, mm) โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ และน้ำหนักผลไม้ถูกวัดโดยเครื่องชั่ง รูปร่างผลไม้ (Fruit shape) ถูกกำหนดโดยความยาวต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง และปริมาตรน้ำผลไม้วัดโดยใช้กระบอกตวง และวิเคราะห์ค่าสีในระบบ CIE (L^* , a^* , b^*) ด้วยเครื่องวัดสี Colorimeter ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คุณลักษณะทางกายภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน

ระยะการสุก	Weight (g)	Length (L, mm)	Diameter (D, mm)	Fruit shape (L/D)	Juice yield (mL)
ผลดิบ	2.56±0.40 ^b	20.66±1.58 ^b	8.10±0.64 ^b	2.55±0.16 ^a	27.60
ผลห่าม	2.60±0.54 ^b	20.31±1.24 ^b	8.21±0.43 ^b	2.48±0.12 ^b	28.00
ผลแก่	3.02±0.56 ^a	21.54±1.70 ^a	8.63±0.50 ^a	2.50±0.11 ^{ab}	30.30
ผลสุก	2.42±0.35 ^b	20.50±1.23 ^b	8.31±0.45 ^b	2.47±0.14 ^b	28.80

ค่าเฉลี่ย (n=30) ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ขนาดของผลไม้เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเลือกซื้อของผู้บริโภค โดยในแต่ละระยะการสุกจะให้คุณลักษณะทางกายภาพโดยเฉลี่ยของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ระหว่างผลแก่และระยะการสุกอื่นๆ

โดยทั่วไปน้ำหนัก ความยาว และความกว้างของผลไม้จะเพิ่มขึ้นตามลำดับการสุก ผลการศึกษาพบว่า น้ำหนักผลไม้เพิ่มขึ้นจาก 2.56±0.40 กรัม ที่ระยะผลดิบ เป็น 3.02±0.56 กรัม ที่ระยะผลแก่ ความยาวและความกว้างของผลมีขนาดใกล้เคียงกัน ยกเว้นที่ระยะผลแก่มีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (21.54±1.70 มิลลิเมตร สำหรับความยาว และ 8.63±0.50 มิลลิเมตร สำหรับความกว้าง) และเมื่อระยะการสุกที่มากขึ้นขนาดของผลไม้ที่ได้จะลดลง โดยขนาดของผลไม้ที่ลดลงอย่างมี

นัยสำคัญที่ระยะผลสุก ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องจากภาวะขาดน้ำของผลไม้ที่ระยะผลสุก (Bain, 1958; Farooq et al., 2011; Tadeo et al., 2003)

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการที่มีผลต่อความต้องการของผู้บริโภคและการซื้อขายในตลาด คือ คุณลักษณะสีของผลไม้และสีน้ำผลไม้ จากลักษณะทางกายภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ สีผิวของผลมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวชมพูเป็นสีดำในระหว่างการสุกของผล ซึ่งแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของสีอย่างสังเกตเห็นได้ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าสีในระบบ CIE ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน

ระยะการสุก	Color			hue angle (H°)	Chroma (C*)
	L*	a*	b*		
ผลดิบ	56.97±0.05 ^a	16.02±0.04 ^d	25.02±0.04 ^a	57.36±0.10 ^a	29.71±0.02 ^c
ผลห่าม	44.87±0.06 ^b	32.27±0.07 ^b	15.82±0.08 ^b	26.09±0.15 ^b	35.97±0.01 ^a
ผลแก่	26.34±0.05 ^c	33.71±0.20 ^a	10.43±0.14 ^c	17.19±0.31 ^c	35.28±0.15 ^b
ผลสุก	13.31±0.27 ^d	18.73±0.21 ^c	1.87±0.11 ^d	5.70±0.29 ^d	18.82±0.21 ^d

ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

การวิเคราะห์ค่าสีแสดงในรูปแบบของระบบ CIE โดยการเปลี่ยนแปลงสีของผลไม้คำนวณโดยใช้ความแตกต่างของค่า L*, a*, b*, H° และ C* ซึ่งค่า L* แสดงถึงความสว่างของผลไม้ ค่า a* และ b* แสดงสีเขียว (-a*)/ สีแดง (+a*) และ สีน้ำเงิน (-b*)/ สีเหลือง (+b*) (Liu et al., 2015) ส่วนค่า H° เป็นค่ามุมของสี (Hue angle) บ่งบอกสีของตัวอย่าง (0° หรือ 360° = สีแดง, 90° = สีเหลือง, 180° = สีเขียว และ 270° = สีน้ำเงิน) ค่า Chroma (C*) แสดงความบริสุทธิ์หรือความอิ่มตัวของสี ค่าที่สูงจะมีความสดใสมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่า ค่าในระบบ CIE (+a*) มีสีแดงเข้มเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมากจากระยะผลดิบไปยังระยะผลแก่ และลดลงอย่างรวดเร็วที่ระยะผลสุก ค่า C* ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่แสดงแนวโน้มทำนองเดียวกันกับค่า a* แต่ค่า L*, b* และ H° ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระยะการสุกสูงขึ้น ผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสีของผลไม้จะเปลี่ยนจากสีชมพูค่อนข้างแดงไปเป็นสีแดงค่อนข้างดำ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของผลไม้ ซึ่งสีของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่นั้นเป็นผลมาจากการสังเคราะห์และการสะสมของสารแอนโทไซยานิน (Schulz et al., 2015)

4.1.1.2 คุณลักษณะทางเคมี (Chemical analysis)

เมื่อนำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้ง 4 ระยะมาผ่าเอาเมล็ดออก ปั่นให้ละเอียด เพื่อทำการวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี ซึ่งได้แก่ ค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด

จากผลการทดลอง ซึ่งแสดงในตารางที่ 7 พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS, °Brix) ของน้ำผลไม้มีค่าต่ำสุดที่ระยะผลดิบ (7.00 °Brix) ส่วนผลสุกมีปริมาณสูงสุด (10.00 °Brix) และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ทั้งนี้ เนื่องมาจากกระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) ของแป้งเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลตามกระบวนการสุกของผลไม้ (Fawole & Opara, 2013) ซึ่งปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงบ่งบอกถึงความหวานและเกี่ยวข้องกับปริมาณกรดที่ลดลงของผลไม้ นั้นด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 7 ลักษณะทางเคมีของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน

ระยะการสุก	TSS (°Brix)	pH	TA (% citric acid equivalent)	Total sugar (mg Glucose/g fresh weight)
ผลดิบ	7.00±0.0 ^d	2.65±0.02 ^d	3.84±0.00 ^a	4.08±0.11 ^d
ผลห่าม	8.00±0.0 ^c	2.84±0.01 ^c	3.46±0.00 ^b	9.05±0.13 ^c
ผลแก่	9.00±0.0 ^b	2.92±0.01 ^b	3.07±0.00 ^c	10.56±0.09 ^b
ผลสุก	10.00±0.0 ^a	2.98±0.01 ^a	2.43±0.11 ^d	20.74±0.22 ^a

ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากการวัดค่าพีเอช (pH) โดยใช้ pH meter ของน้ำคั้นมะม่วงหาวมะนาวโห่ พบว่า ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากระยะผลดิบ (pH = 2.65) สู่ระยะผลสุก (pH = 2.98) สำหรับปริมาณกรดทั้งหมด พบว่า ปริมาณกรดลดลงตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จาก 3.84 เป็น 2.43% citric acid equivalent โดยปริมาณกรดในผลไม้ส่วนใหญ่ที่ลดลงเกิดเนื่องจากกรดจะถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของการหายใจ (Respiratory substrates) และเป็นโครงสร้างคาร์บอน (Carbon skeleton) ของการสังเคราะห์สารชนิดใหม่ในระหว่างการสุก (Jiménez et al., 2011) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol-sulfuric พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมากในระหว่างการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 4.08 ถึง 20.74 mg glucose/g fresh weight ทั้งนี้ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงเป็น

น้ำตาลโดยเอนไซม์ α -amylase และเอนไซม์ β -amylase (do Nascimento et al., 2006) เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ นั่นคือปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้แปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เนื่องจากสารประกอบส่วนใหญ่ที่ละลายน้ำได้ในผลไม้มักจะเป็นน้ำตาล (Zainudin et al., 2014) ซึ่งน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโตส (Kubola et al., 2011)

4.2 ตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 การทดสอบปริมาณสารพฤกษเคมี

การหาปริมาณสารพฤกษเคมี ประกอบด้วยฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน พบว่าปริมาณสารพฤกษเคมีเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โมโนเมอร์แอนโทไซยานิน (pH-differential method) ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน

ระยะการสุก	TPC ($\mu\text{g GAE/g fresh weight}$)	TFC ($\mu\text{g RE/g fresh weight}$)	Monomeric anthocyanins ($\mu\text{g/g fresh weight}$)
ผลดิบ	118.36 \pm 1.69 ^d	133.24 \pm 3.30 ^d	0.42 \pm 0.10 ^d
ผลห่าม	171.14 \pm 1.61 ^c	179.51 \pm 6.24 ^c	2.84 \pm 0.99 ^c
ผลแก่	226.21 \pm 1.75 ^b	360.46 \pm 5.06 ^b	29.87 \pm 2.02 ^b
ผลสุก	337.70 \pm 2.72 ^a	658.43 \pm 8.42 ^a	61.47 \pm 1.13 ^a

ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ ซึ่งมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (Rice-Evans & Miller, 1996) หลักการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก คือสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเกิดเป็น Tungsten และ Molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างคำนวณได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid)

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) เพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กล่าวคือ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าน้อยที่สุดในระยะผลดิบ ($118.36 \mu\text{g GAE/g fresh weight}$) ในขณะที่ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดในระยะผลสุก ซึ่งมีค่าเท่ากับ $337.70 \mu\text{g GAE/g fresh weight}$

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบฟีนอลิก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จะพบมากในพืชผักและผลไม้ อีกทั้งยังเป็นรงควัตถุ ทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง โดยการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะทำการคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานรูติน (RE) ในการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะใช้วิธี Aluminium chloride colorimetric การเกิดปฏิกิริยาเริ่มขึ้นโดย AlCl_3 ที่เติมในปฏิกิริยา จะไปเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารฟลาโวนอยด์ ที่เรียกว่า Acid stable complexes ในตำแหน่ง C-4 keto groups และ C-3 หรือ C-5 hydroxyl group ของฟลาโวนอยด์ในสารสกัด เมื่อเติม NaOH ลงไป สารผสมนั้นจะกลายเป็นสีชมพู ซึ่งติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ $133.24 \mu\text{g RE/g fresh weight}$ ที่ระยะผลดิบ และมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ $658.43 \mu\text{g RE/g fresh weight}$ ที่ระยะผลสุก

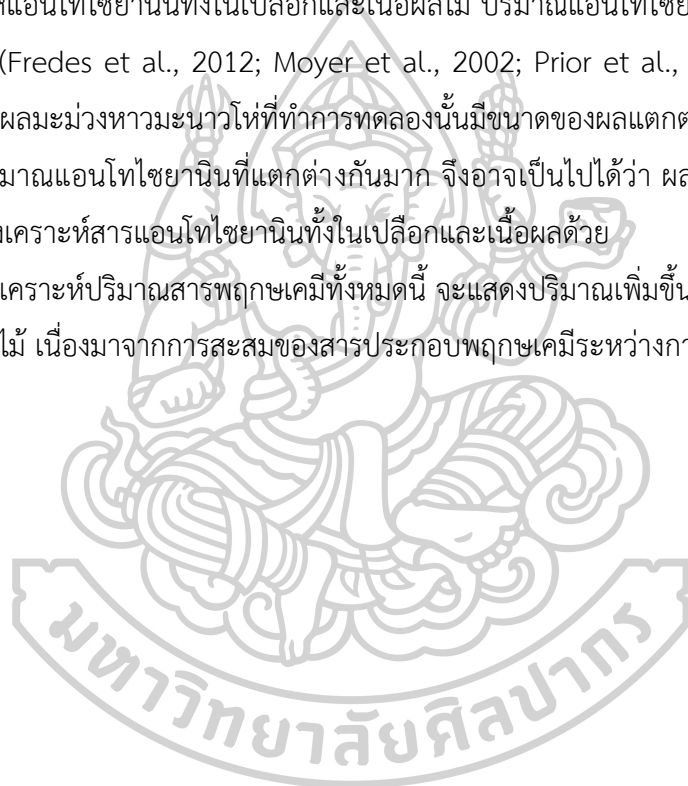
Lee และ Hwang (2017) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของผลหม่อน (Mulberry) ที่มีระยะการสุกแตกต่างกัน 7 ระยะ พบว่า จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณแอนโทไซยานินของผลหม่อนนั้น สารฟลิกษเคมีที่ทำการทดสอบมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าระยะการสุกมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟลิกษเคมี ซึ่งอาจเนื่องมาจากการสะสมสารเหล่านี้ในระหว่างการสุก (Lee & Hwang, 2017)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในพืช ทั้งในดอกและในผล ให้สีแดง ม่วง และน้ำเงิน ละลายน้ำได้ดี จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยสารประกอบ 3 ชนิด ได้แก่ แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin) หรืออะไกลโคโคน (Aglycone) น้ำตาล และกรด ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ และวิธี pH-differential โดยในการทดสอบนี้จะใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) และ pH-differential method ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาจากการที่โครงสร้างของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไปตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ทำให้การดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินเปลี่ยนไป เนื่องจาก

แอนโทไซยานินจะคงตัวที่ pH ต่ำ ซึ่งจะมีสี และสามารถวัดที่ค่าความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แต่เมื่อค่า pH สูงขึ้น จะสลายตัวเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปทำให้ไม่มีสีเกิดขึ้น

จากผลการทดลองหาปริมาณโมโนเมอร์แอนโทไซยานิน ด้วยวิธี pH-differential พบว่าแอนโทไซยานินมีปริมาณที่แตกต่างกัน และเพิ่มขึ้นตามระยะการสุก จาก 0.42 ถึง 61.47 $\mu\text{g/g}$ fresh weight ของระยะผลดิบและผลสุก ตามลำดับ โดยได้มีการอธิบายถึงความเกี่ยวข้องของปริมาณแอนโทไซยานินกับขนาดของผลไม้ไว้ว่า เมื่อแอนโทไซยานินถูกสร้างในเปลือกเพียงอย่างเดียว ปริมาณของแอนโทไซยานินที่ได้นั้นจะเปลี่ยนแปลงไปตามขนาดของผล แต่ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทั้งในเปลือกและเนื้อผลไม้ ปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้จะไม่ขึ้นอยู่กับขนาดของผล (Fredes et al., 2012; Moyer et al., 2002; Prior et al., 1998; Rio Segade et al., 2008) ซึ่งผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ทำการทดลองนั้นมีขนาดของผลแตกต่างกันในแต่ละระยะการสุก และได้ปริมาณแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันมาก จึงอาจเป็นไปได้ว่า ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่นี้ อาจเกิดการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินทั้งในเปลือกและเนื้อผลด้วย

การวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีทั้งหมดนี้ จะแสดงปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะการสุกของผลไม้ เนื่องมาจากการสะสมของสารประกอบพฤกษเคมีระหว่างการเจริญเติบโตและระยะการสุก



4.2.2 การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบกิจกรรมการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-DPPH assay) และการทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP assay) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การทดสอบกิจกรรมการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน

ระยะการสุก	DPPH (IC ₅₀ ; mg/mL)	FRAP (µg FeSO ₄ ·7H ₂ O/g fresh weight)
ผลดิบ	8.045±0.906 ^a	2.168±0.058 ^d
ผลห่าม	5.274±0.370 ^b	2.491±0.000 ^c
ผลแก่	2.348±0.171 ^c	3.439±0.093 ^b
ผลสุก	2.018±0.093 ^c	4.517±0.000 ^a

ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นสารอนุมูลอิสระ สามารถรับ electron หรือ hydrogen radical ได้ ซึ่งเมื่อ DPPH อยู่ในรูปสารละลายในตัวทำละลายเมทานอลจะมีสีม่วง และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีสีจางลงจนเป็นสีเหลือง จากการทดสอบการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH ที่แสดงผลในรูปของ ค่า IC₅₀ (mg/mL) ซึ่งหมายถึง ค่าความเข้มข้นที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระลงไปครึ่งหนึ่ง (50%) กล่าวคือ ค่า IC₅₀ น้อย จะแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า IC₅₀ ที่มีค่ามาก ซึ่งในผลการทดลองนี้ การทดสอบการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH ของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีระยะการสุกที่แตกต่างกันให้ค่า IC₅₀ ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยที่ระยะผลสุก (Fully-ripe) ได้ค่า IC₅₀ ที่น้อยที่สุด เท่ากับ 2.018 mg/mL จากผลการทดลองนี้ แสดงถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดในระยะผลสุกของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

วิธีทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ หรือ FRAP assay ถูกเลือกมาทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดย FRAP assay เป็นการวัดความสามารถของสารตัวอย่างในการรีดิวซ์ Ferric tripyridyltriazine (Fe³⁺-TPTZ) ให้อยู่ในรูป Fe²⁺ จากผลการทดลองซึ่งแสดงในตารางที่ 9 พบว่า ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) มีค่าอยู่ในช่วง 2.168 ถึง 4.517 µg FeSO₄·7H₂O/g fresh weight โดยที่ระยะผลสุก (Fully-ripe) มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์มากที่สุด ทั้งนี้ ความสามารถในการเป็นตัว

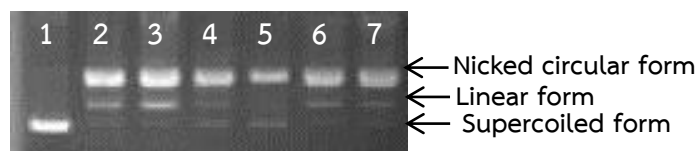
รีดิวิซ์ (FRAP) จะขึ้นอยู่กับสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในผลไม้ ซึ่งเคยมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า ผลส้มที่เก็บเกี่ยวจากระยะการสุกที่ต่างกันให้ผลของความสามารถในการเป็นตัวรีดิวิซ์ ต่างกัน และผลส้มที่ระยะสุกจะให้ค่าความสามารถในการเป็นตัวรีดิวิซ์เพิ่มขึ้นจากระยะผลอ่อน (Huang et al., 2007) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสุกของผลไม้

การต้านอนุมูลอิสระของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกที่แตกต่างกันของผลไม้ อาจเนื่องมาจากการสะสมของปริมาณสารพฤกษเคมี ประกอบด้วยฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ แอนโทไซยานินที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างระยะการสุกของผลไม้ โดยผลการทดสอบที่ผ่านมาข้างต้นมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shin และคณะ (2015) ซึ่งได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารพฤกษเคมี และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยทดสอบด้วยวิธี FRAP และ DPPH ของลูกหม่อนจีน (Chinese mulberry) ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน ผลการทดลองพบว่า ที่ระยะผลสุกเต็มที่ (Fully mature stage) จะแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดและมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิก (TPC) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดเช่นกัน (Shin et al., 2015) ซึ่งโดยทั่วไป ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชจะเกี่ยวข้องกับกลุ่มของสารประกอบ ได้แก่ ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Fernando et al., 2013) ดังนั้น ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผลไม้จึงมีผลต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ น้ำตาลรีดิวิซ์ เช่น กลูโคสและฟรุคโตส ยังมีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระด้วย (Morelli et al., 2003)

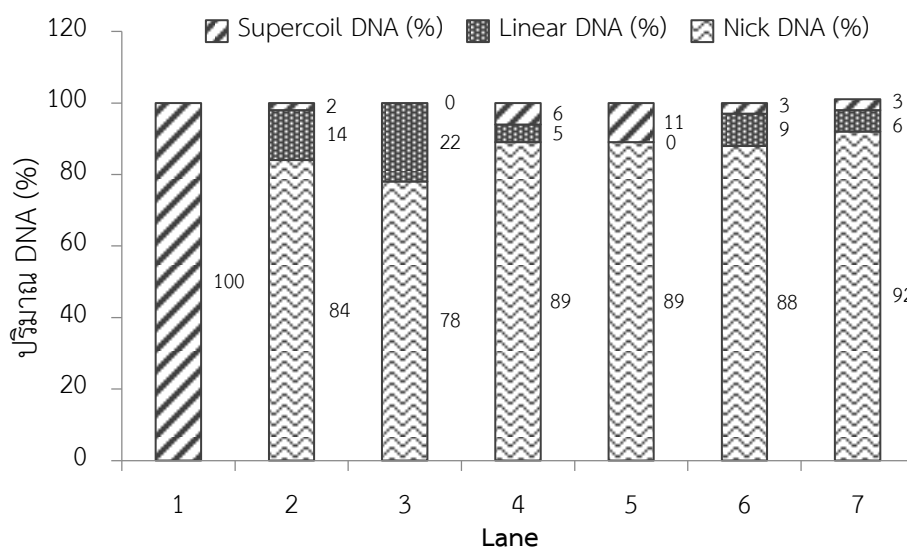


4.3 ทดสอบการป้องกันการแตกหักของ DNA (DNA nicking assay)

การป้องกันความเสียหายบน plasmid DNA pBR322 ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง DNA เท่ากับ 200 $\mu\text{g/mL}$ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 15 และปริมาณ DNA ในแต่ละรูปแบบที่ได้จาก Agarose gel แสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 15 การป้องกันความเสียหายของ DNA จากสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ (200 $\mu\text{g/mL}$)
 Lane 1: Control (Distilled water + DNA) Lane 2: Positive control (DNA + Rutin + Fr)
 Lane 3: Negative control (DNA + Fr) Lane 4, 5, 6, 7: มะม่วงหาวมะนาวโห่ (ระยะผลดิบ, ห้าม, แก่ และสุก ตามลำดับ) + DNA + Fr เมื่อ Fr = Fenton's reagent



ภาพที่ 16 ปริมาณ DNA (%) ในแต่ละรูปแบบที่ได้จาก agarose gel ซึ่งแสดงในภาพที่ 15 โดยใช้โปรแกรม ImageJ ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

วิธีการนี้เป็นการตรวจสอบความสามารถของสารทดสอบในการป้องกันความเสียหายโครงสร้างของ DNA จากการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ หลักการคือ ปฏิกิริยาเฟนต์ัน (Fenton's reagent) เป็นปฏิกิริยาที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเร่งการสลายตัวของเหล็กและสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายบน DNA ในการตอบสนองต่อระดับต่างๆ ของการออกซิเดชัน (Benherlal & Arumugan, 2008) โดยอนุมูลอิสระจะตัดทำลายพลาสมิด DNA pBR322 จาก

รูปแบบ Supercoiled เปลี่ยนแปลงไปเป็นรูปแบบ Nicked circular และ Linear ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 15

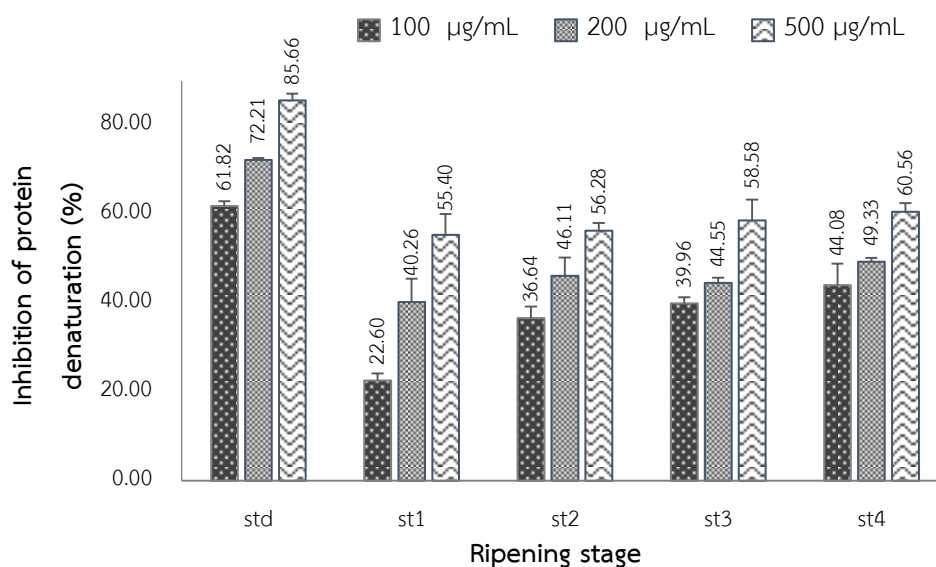
Lane 1 แสดงแถบ DNA ในรูปแบบ Supercoiled 100% (control) และใน Lane 2 (Positive control) เมื่อเติมสาร Rutin ลงไปผสมกับ Fenton's reagent พบว่า DNA เปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบ Nicked circular 84%, Linear 14% และคงรูปแบบ Supercoiled อยู่เพียง 2% ส่วนใน Lane 3 (Negative control) เมื่อพลาสมิด DNA pBR322 ทำปฏิกิริยากับ Fenton's reagent (6 μ L) โดยไม่มีการเติมสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างของ DNA ในรูปแบบ Supercoiled เกิดการถูกทำลายอย่างรุนแรงและได้สูญหายไป ซึ่งบ่งบอกว่า DNA นั้นถูกทำลายเรียบร้อยแล้ว ทำให้ DNA เปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบ Nicked circular 78% และรูปแบบ Linear สูงถึง 22% และ Lane 4, 5, 6 และ 7 เติมน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่แต่ละระยะการสุกลงไปกับส่วนผสมต่างๆ พบว่า ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ แสดงแถบที่สอดคล้องกับ Nicked circular DNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และช่วยคงสภาพในรูปแบบ Supercoiled ไว้ได้ บ่งบอกถึงการยับยั้งการตัดสาย DNA ซึ่งเคยมีรายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ได้จากสารสกัดของพืชจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจาก Fenton's reagent (Albishi et al., 2013; Halliwell & Gutteridge, 1990; Zafar et al., 2011) ในกรณีที่ไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลเพอร์ออกซิลจะไปดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจาก DNA ไกล่เคียงมาเพื่อทำให้อนุมูล DNA ใหม่ที่เสถียรขึ้นซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ไปเรื่อยๆ เป็นผลให้โมเลกุลของ DNA เกิดการแตกหัก ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจะหยุดการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โดยดึงอะตอมไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระไปแทน (Hu & Kitts, 2000)

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่า มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะต่างๆ นั้น มีคุณสมบัติในการป้องกันและต่อต้านความเสียหายบน plasmid DNA pBR322 โดยที่ระยะผลท่อมจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันและต่อต้านความเสียหายมากที่สุด และเมื่อเทียบกับ positive control ที่เป็นสาร rutin เพียงอย่างเดียว จะสามารถป้องกันความเสียหายให้อยู่ในรูปแบบเดิมของ DNA (Supercoiled) ไว้ได้มากที่สุด และ DNA ไม่เปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบ Linear ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมะม่วงหาวมะนาวโห่ประกอบไปด้วยสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และวิตามินซี ซึ่งมีส่วนช่วยในการยับยั้งการทำลาย DNA รองลงมาคือ ระยะเวลาผลดิบ แก่ และระยะเวลาผลสุกมีความสามารถในการป้องกันการแตกหักของ DNA น้อยที่สุด

4.4 กิจกรรมต้านการอักเสบ (*In vitro* anti-inflammatory activity)

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดอาการบาดเจ็บเป็นผลให้มีอาการปวด บวม แดง และร้อน รวมไปถึงเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ มีการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังบริเวณหลอดเลือด การเสียสภาพของโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้น และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการเสียสภาพของโปรตีนเป็นกระบวนการที่โปรตีนสูญเสียโครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) และโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) โดยการใช้ความเครียดภายนอกหรือสารประกอบ เช่น กรดหรือเบสที่เข้มข้น ความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือความร้อน ทำให้ไม่สามารถแสดงหน้าที่ทางชีวภาพได้อีกและยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ดี (Anoop & Bindu, 2015) ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการใช้ความร้อนในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) หรือ พันธะไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) ของโปรตีนจะถูกทำลาย และไปทำลายโครงสร้างของโปรตีนทำให้เกิดการตกตะกอนขึ้น

ผลการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีความเข้มข้นที่ต่างกัน (100, 200 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ที่มีระยะเวลาสุกที่ต่างกัน แสดงดังในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 เปรียบเทียบการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีความเข้มข้น 100, 200 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่มีระยะเวลาสุกที่ต่างกัน เมื่อ std คือ Diclofenac sodium, st1 คือ ผลดิบ, st2 คือ ผลห่าม, st3 คือ ผลแก่ และ st4 คือ ผลสุก

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 17 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกของผลไม้ และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อการยับยั้งการเสียหายของโปรตีนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วย ($P < 0.05$) นั้นแสดงให้เห็นว่า มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีระยะการสุกต่างกันในความเข้มข้นต่างๆ ที่ทำการทดสอบ (100, 200 และ 500 $\mu\text{g/mL}$) แสดงการยับยั้งการเสียหายของโปรตีน (Egg albumin) และในการทดลองนี้มีการเปรียบเทียบโดยใช้ Diclofenac sodium ซึ่งเป็นยามาตรฐานทำการทดลองด้วย โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 61.82, 72.21 และ 85.66% สำหรับความเข้มข้น 100, 200 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ในระยะการสุกต่างๆ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำกว่ายามาตรฐาน Diclofenac sodium

ผลที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Javad Sharifi-Rad และคณะ (2015) ได้ทำการทดลองกิจกรรมการยับยั้งการเสียหายของโปรตีนในผลไม้ *Nitraria schoberi* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในประเทศอิหร่าน ได้ทำการทดลองที่คล้ายกัน และได้ผลเช่นเดียวกัน คือเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเสียหายของโปรตีนจะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มมากขึ้นด้วย (Sharifi-Rad et al., 2015)

Sergent และคณะ (2010) ได้กล่าวว่า สารประกอบฟีนอลิกถือได้ว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ และมีการนำเอาสารประกอบนี้ซึ่งเป็นทางเลือกธรรมชาติมาใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคอักเสบเรื้อรัง (Sergent et al., 2010) โดยจากผลการทดลองแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกของผลไม้ และจากตารางที่ 8 แสดงสารประกอบฟีนอลิกในมะม่วงหาวมะนาวโห่มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะการสุก อาจเป็นไปได้ว่า สารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้นจะสามารถช่วยยับยั้งการเสียหายของโปรตีนได้มากขึ้นตามไปด้วย แต่ทั้งนี้ ยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยกิจกรรมต้านการอักเสบ (*In vitro* anti-inflammatory activity) ของระยะการสุกผลไม้ที่ต่างกันมาก่อน จึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด จึงต้องมีการศึกษาต่อไป

4.5 การทดสอบคุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ โดยทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* และแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureas* ในการทดลองจะเทียบกับ positive control ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) 3 ชนิด คือ Ampicilin, Chloramphenicol และ Gentamicin ผลการทดลองพบว่า มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน คือ ระยะผลดิบ ผลห่าม ผลแก่ และผลสุก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ ดังแสดงตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Antibiotics และมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ (50 mg/mL) ที่ระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง

	Treatment	Diameter of inhibition zone (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureas</i>
Antibiotics	Ampicilin (10 µg/disc)	28.0±1.4 ^b	9.0±0.0 ^{bc}	32.0±0.0 ^a	26.5±0.7 ^a
	Gentamicin (30 µg/disc)	17.5±0.7 ^c	16.0±1.4 ^a	22.0±0.0 ^b	18.5±2.1 ^b
	Chloramphenicol (10 µg/disc)	30.0±0.0 ^a	9.5±0.7 ^{bc}	32.0±0.0 ^a	27.0±0.0 ^a
<i>Carissa carandas</i> (50 mg/mL)	ผลดิบ	9.0±1.4 ^d	10.0±0.0 ^b	9.5±0.5 ^c	7.5±0.5 ^c
	ผลห่าม	8.7±0.6 ^d	10.7±0.6 ^b	8.7±0.6 ^d	7.3±0.6 ^c
	ผลแก่	9.3±0.6 ^d	9.0±2.0 ^{bc}	8.3±0.3 ^d	7.2±0.3 ^c
	ผลสุก	8.7±0.6 ^d	7.3±0.6 ^c	8.2±0.3 ^d	6.8±0.3 ^c

ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากตารางที่ 10 พบว่า มะม่วงหาวมะนาวโห่ระยะต่างๆ ที่ความเข้มข้น 50 mg/mL มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก นั่นคือ ยับยั้ง *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* และ *S. aureas* ได้ทุกระยะการสุก และระยะการสุกยังส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอีกด้วย

จากผลการทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ พบว่า แบคทีเรียแกรมลบที่ระยะผลดิบแสดงประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ดีที่สุด และแสดงบริเวณในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้มากที่สุด ซึ่งเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตร ส่วน *E. coli* แสดงบริเวณในการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 9.0 มิลลิเมตร, *S. typhimurium*

เท่ากับ 9.5 มิลลิเมตร และแบคทีเรียแกรมบวกที่ระยะการสุกไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มนี้

จากค่าบริเวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบแสดงค่าที่มากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบมากกว่า เนื่องจากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบจะบางกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Verma และ Chaudhary (2011) ศึกษาผลของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas*) ที่วิเคราะห์โดยไม่คำนึงถึงระยะการสุกต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี disc diffusion โดยใช้สารสกัดจากใบและผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยตัวทำละลายไม่มีขี้ผึ้ง ผลการทดลอง พบว่า ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยตัวทำละลายที่ต่างกันคือ Acetone, Chloroform, Dichloromethane และ Toluene แสดงบริเวณในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้สูงที่สุดเท่ากับ 12, 6, 20 และ 6 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ *S. aureus* ไม่แสดงบริเวณในการยับยั้งเชื้อเลย (Verma & Chaudhary, 2011)

Lin และคณะ (2004) กล่าวว่า สารประกอบฟีนอลิกไม่เพียงแต่เป็นตัวแทนของกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระเท่านั้น แต่ยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารที่ต่อต้านจุลชีพที่มีส่วนช่วยในการต่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่สกัดได้จากพืชอีกด้วย (Lin et al., 2004) อีกทั้งกลุ่ม -OH ที่อยู่ในสารประกอบฟีนอลิกมีหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Gelsman, 1963) กิจกรรมยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารทุติยภูมิในพืชต่างๆ นี้สามารถอธิบายได้จากกลไกการทำงานของแบคทีเรีย ได้แก่ การขัดขวางการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย การจับของโปรตีนและผนังเซลล์ การยับยั้งของเอนไซม์แบคทีเรีย และการแทรกเข้าไปในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (Brooks et al., 1998; Pelczar et al., 1998)

Nychas และ Tassou (1999) ได้รายงานถึงกลไกในการทำลายจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช เช่น ย่อยสลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มโปรตีน (Lambert et al., 2001) ทำให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วไหลออกมาทำให้อวัยวะภายในเซลล์ตกตะกอน (Burt, 2004) และการเคลื่อนที่ของโปรตอนภายในเซลล์บกพร่อง (Proton motive force) (Nychas & Tassou, 1999)

4.6 กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase activity)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยทองแดง (Cu) อยู่ในโครงสร้าง โดยทั่วไปเอนไซม์ไทโรซิเนสจะพบในเชื้อรา พืช และสัตว์ (Huang et al., 2006) เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) โดย Cu ที่อยู่ภายในเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเข้าจับกับ L-DOPA ทำให้เกิดเป็นเมลานิน (Melanin) ซึ่งกระบวนการนี้ทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลง และอาจเป็นสาเหตุของโรคผิวหนังซึ่งนำไปสู่โรคมะเร็งผิวหนัง นอกจากนี้การสังเคราะห์เมลานินจะทำให้เกิดสารตัวกลางที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรงมาก เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ดังนั้น สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และใช้ทางคลินิกในการจัดการกับปัญหาผิวหมองคล้ำและมะเร็งผิวหนัง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารเหล่านั้นและกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย (Perluige et al., 2003)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ ความเข้มข้น 1 mg/mL

Treatment	Percentage inhibition (%)
Kojic acid (Std; 200 µg/mL)	70.08±0.57 ^a
ผลดิบ	29.06±0.53 ^d
ผลห่าม	30.92±0.17 ^c
ผลแก่	41.11±0.14 ^b
ผลสุก	29.45±1.78 ^{cd}

ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากการทดลองนี้ มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกแตกต่างกัน คือ ผลดิบ ผลห่าม ผลแก่ และผลสุก ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรเนส เทียบกับ Positive control คือ Kojic acid ซึ่งเป็นสารที่ยอมรับให้ใช้ในเครื่องสำอางจาก FDA (Food and Drug Administration) พบว่า สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกทั้ง 4 ระยะ สามารถยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไทโรเนส โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 29.06%, 30.92%, 41.11% และ 29.45% สำหรับผลดิบ ผลห่าม ผลแก่ และผลสุก ตามลำดับ เทียบกับ Kojic acid มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 70.08%

Chang (2009) แสดงให้เห็นว่า สารประกอบพลาโวนอยด์นั้นมีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย (Chang, 2009) อีกทั้งสารประกอบที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอาจทำหน้าที่ในการยับยั้งควบคู่กันไปกับกลไกที่แตกต่างกัน และสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปส่งเสริมการทำงานร่วมกัน โดยทั่วไปจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิกจะมีอิทธิพลต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Alam et al., 2011) ดังนั้น สารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงอาจเป็นกลไกที่สำคัญในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

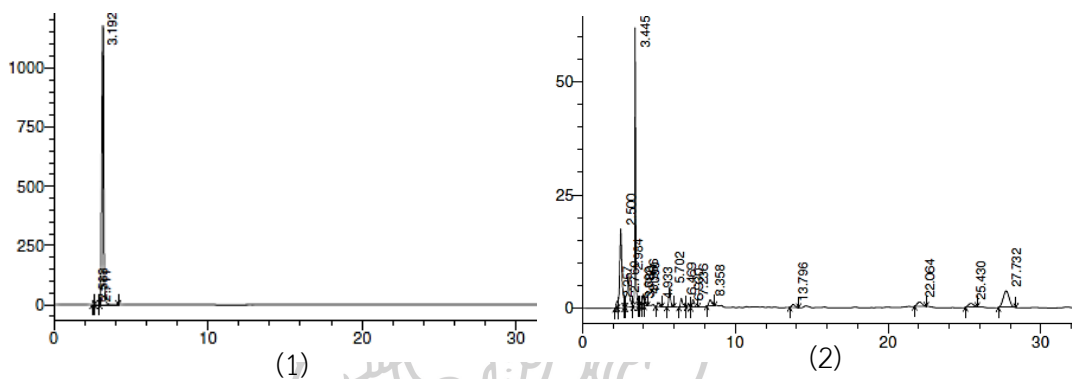
รายงานวิจัยของ Lerner และ Fitzpatrick (1950) กล่าวว่า วิตามินซีมีการใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการรักษาจุดด่างดำ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) (Lerner & Fitzpatrick, 1950) อีกทั้งมีรายงานวิจัยของ Choi และคณะ (2010) ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของวิตามินซี (Vitamin C) และวิตามินรวม (Multivitamin) ผลการทดลองพบว่า วิตามินซีมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากเห็ด แต่วิตามินรวมไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (Choi et al., 2010)

จากผลการทดลองนี้ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ได้มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามระยะการสุก และลดลงที่ระยะผลสุก ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณวิตามินซีที่ได้ทำการวิเคราะห์ อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสขึ้นอยู่กับปริมาณวิตามินซีด้วย โดยที่ผลแกมมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีที่สุดที่ $41.11 \pm 0.14\%$ และขณะที่ผลแกมมีปริมาณวิตามินซีที่มากที่สุดเช่นกัน

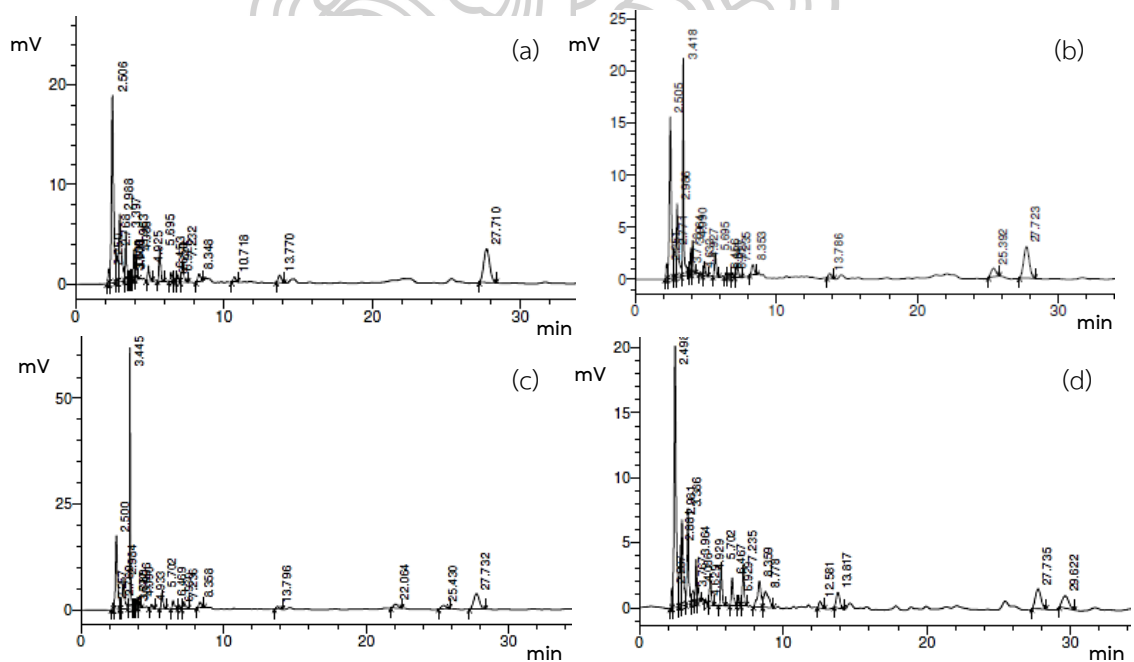
งานวิจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่า วิตามินซีสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากเห็ด แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเอนไซม์นั้นอาจไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณ ซึ่งมีงานวิจัยบางรายงานกล่าวไว้ว่า วิตามินซีไม่มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส (Lerner & Fitzpatrick, 1950; Ros et al., 1993) อีกทั้ง Kameyama และคณะ (1996) รายงานว่า การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีของวิตามินซีนั้น อาจเกิดจากการทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ขั้นตอนที่เกิดจากออกซิเดชันต่างๆ ของการสร้างเมลานิน โดยในการศึกษานี้กิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นลดลงโดยผ่านตัวกลางคือ วิตามินซีที่เกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่ใช่การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยตรง (Kameyama et al., 1996)

4.7 การหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ HPLC

เมื่อนำผลสดของมะม่วงหาวมะนาวโห่แต่ละระยะการสุกมาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้วิธีของ Kubola และคณะ (2011) ผลที่ได้สามารถแสดงดังภาพที่ 18 โดย (1) เป็น HPLC โครมาโตแกรมของ 0.2 mg/ml Ascorbic acid ซึ่งมี Retention time (RT) ที่ 3.192 นาที และ (2) คือ HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะผลแก่ ซึ่งมี Retention time (RT) ที่ 3.445 นาที

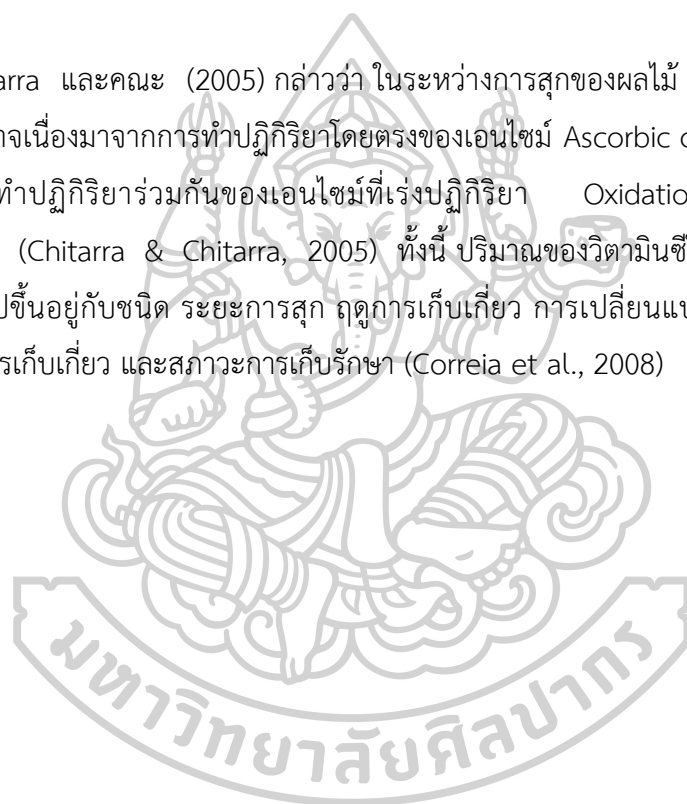


ภาพที่ 18 HPLC โครมาโตแกรม (1) Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.2 mg/ml
(2) มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะผลแก่ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



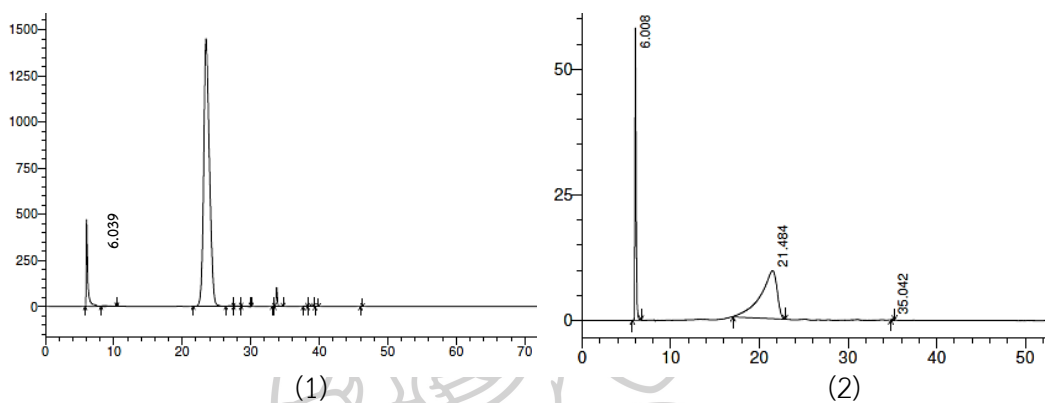
การวัดปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid ผลการทดลองพบว่า วิตามินซีมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากระยะผลดิบไปยังผลห่าม และผลแก่ (ripe) (0.0045, 0.0135 และ 0.0300 mg/g fresh weight ตามลำดับ) และลดลงอย่างมากในระยะผลสุก (0.0070 mg/g fresh weight) โดย HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ จะแสดงดังภาพที่ 19 โดย (a), (b), (c) และ (d) เป็น HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะผลดิบ ห่าม แก่ และสุก ซึ่งมี Retention time (RT) ที่ 3.397, 3.418, 3.445 และ 3.386 นาทีตามลำดับ

Chitarra และคณะ (2005) กล่าวว่า ในระหว่างการสุกของผลไม้ ปริมาณวิตามินซีจะมีค่าลดลงเสมอ อาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาโดยตรงของเอนไซม์ Ascorbic oxidase (Ascorbinase) หรือโดยการทำปฏิกิริยาร่วมกันของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา Oxidation เช่น เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) (Chitarra & Chitarra, 2005) ทั้งนี้ ปริมาณของวิตามินซีในผักและผลไม้ค่อนข้างแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิด ระยะการสุก การเก็บเกี่ยว การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว และสภาวะการเก็บรักษา (Correia et al., 2008)

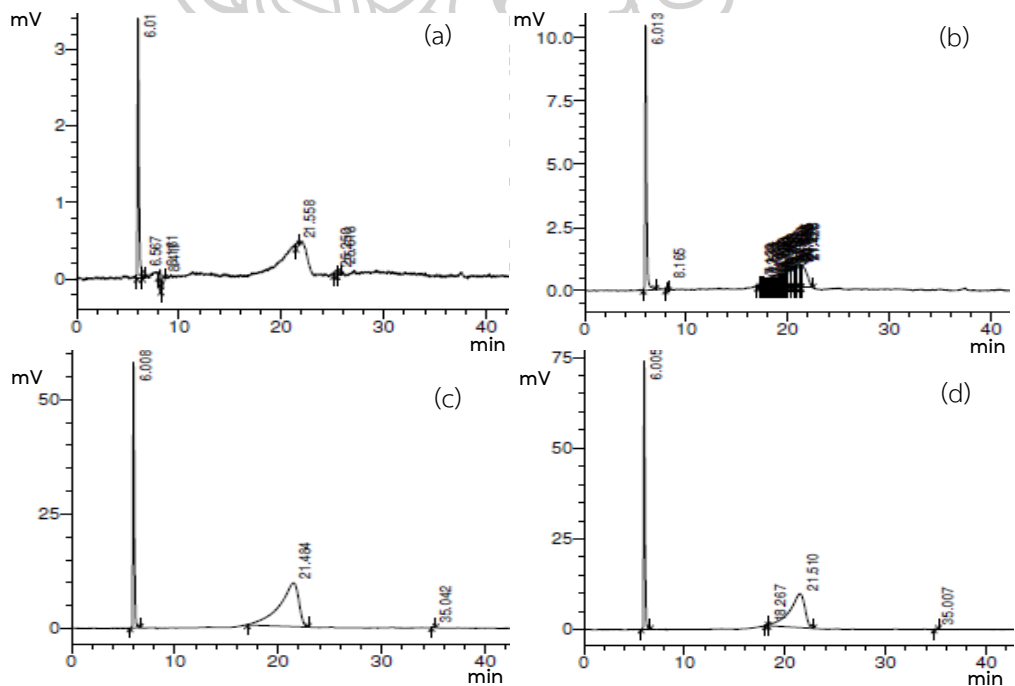


4.8 การหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้ HPLC

เมื่อนำผลแห้งที่ผ่านการ Freeze-dry ของมะม่วงหาวมะนาวโห่แต่ละระยะการสุกมาวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้วิธีของ Ramirez และคณะ (2015) ผลที่ได้สามารถแสดงดังภาพที่ 20 โดยที่ (1) เป็น HPLC โครมาโตแกรมของ 1.0 mg/ml Cyanidin-3-glucoside ซึ่งมี Retention time (RT) ที่ 6.039 นาที และ (2) คือ HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะผลแก่ ซึ่งมี Retention time (RT) ที่ 6.008 นาที



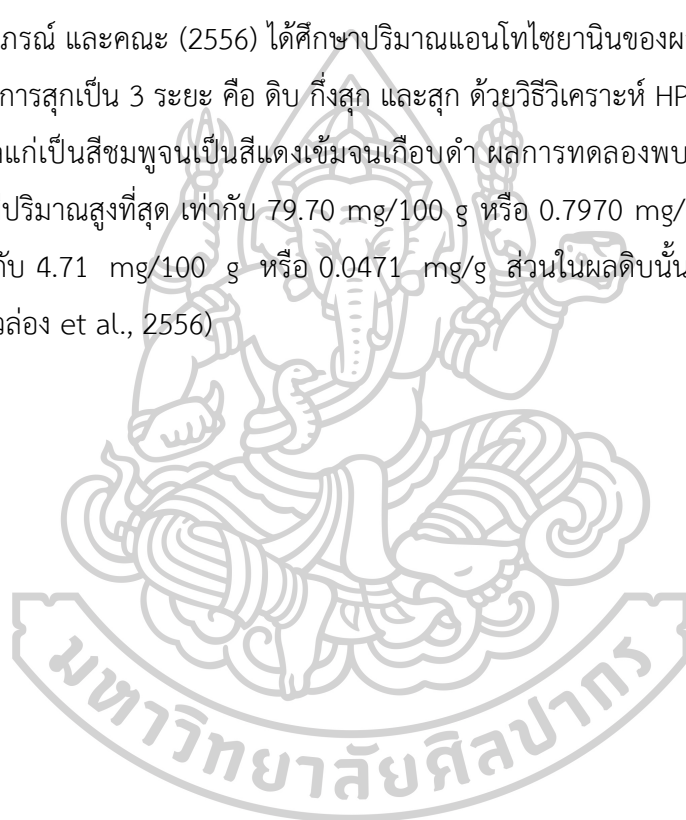
ภาพที่ 20 HPLC โครมาโตแกรม (1) Cyanidin-3-glucoside ความเข้มข้น 1.0 mg/ml
(2) มะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะผลแก่ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร



ภาพที่ 21 HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดย (a): ผลดิบ, (b): ผลห่าม, (c): ผลแก่, (d): ผลสุก

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างกัน โดยวิเคราะห์ด้วย HPLC เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Cyanidin-3-glucoside ผลการทดลองพบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินมีค่าสูงขึ้นตามระยะการสุกที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 0.0495, 0.1545, 0.7658 และ 0.9584 mg/g dry weight สำหรับระยะผลดิบ ผลห่าม ผลแก่และผลสุก ตามลำดับ โดย HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะการสุกต่างๆ จะแสดงดังภาพที่ 21 โดย (a), (b), (c) และ (d) เป็น HPLC โครมาโตแกรมของมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ระยะผลดิบ ห่าม แก่ และสุก ซึ่งมี Retention time (RT) ที่ 6.014, 6.013, 6.008 และ 6.005 นาที ตามลำดับ

วชิราภรณ์ และคณะ (2556) ได้ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่แบ่งตามระยะการสุกเป็น 3 ระยะ คือ ดิบ กึ่งสุก และสุก ด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC โดยผลดิบจะเป็นผลอ่อนสีขาว ผลแก่เป็นสีชมพูจนเป็นสีแดงเข้มจนเกือบดำ ผลการทดลองพบว่า ในผลสุกของมะม่วงหาวมะนาวโห่จะมีปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 79.70 mg/100 g หรือ 0.7970 mg/g รองลงมาคือ ผลกึ่งสุก มีปริมาณเท่ากับ 4.71 mg/100 g หรือ 0.0471 mg/g ส่วนในผลดิบนั้นไม่สามารถตรวจสอบได้ (วชิราภรณ์ ฝิวล่อง et al., 2556)



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของระยะการสุกที่มีต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารพฤกษเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยแยกผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ออกเป็น 4 ระยะ คือ ดิบ ห้าม แก่ และสุก

จากการศึกษาพบว่า ที่ระยะผลสุกของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่จะมีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานินที่สูงที่สุด คิดเป็น 337.70 μg GAE/g fresh weight, 658.43 μg RE/g fresh weight และ 61.47 μg /g fresh weight ตามลำดับ และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มากที่สุดด้วย (4.517 μg FeSO₄·7H₂O/g fresh weight สำหรับวิธี FRAP และ IC₅₀ เท่ากับ 2.018 mg/mL สำหรับวิธี DPPH) ดังนั้น ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีการสะสมปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานินในระหว่างการสุกของผล และปริมาณสารพฤกษเคมีเหล่านี้สัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในระหว่างการสุกด้วย

นอกจากนี้ ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ยังแสดงคุณสมบัติทางชีวภาพต่างๆ ในทุกระยะการสุก โดยที่กิจกรรมต้านการอักเสบ สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเสียหายของโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตามระยะการสุกอย่างมีนัยสำคัญ ตรงกันข้ามที่ระยะผลดิบและผลห้าม จะแสดงประสิทธิภาพการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอและคุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด ส่วนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามระยะการสุก แต่จะมีค่าลดลงที่ผลสุก ซึ่งแสดงผลเช่นเดียวกับปริมาณวิตามินซี



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี Phenol-sulfuric

5% Phenol solution

ปิเปต Phenol 5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 mL ในขวดปรับปริมาตร
วิธีการคำนวณ

สารละลาย 100 mL มี Phenol 5 mL

สารละลาย 100 mL มี Phenol $\frac{5 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 5 \text{ mL}$

สารละลาย Glucose

เตรียม Stock Glucose ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 100.00 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 mL มีเนื้อ Glucose อยู่ $1000 \times 10^{-6} \text{ g}$

สารละลาย 100 mL มีเนื้อ Glucose อยู่ $\frac{1000 \times 10^{-6} \text{ g} \times 100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.1 \text{ g}$

ดังนั้นจึง Glucose มา 0.1 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100.00 mL ในขวดปรับ
ปริมาตร

2. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:10 ในน้ำกลั่น) (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ปิเปต Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 5 mL แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 mL

วิธีการคำนวณ

เตรียม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 50 mL

ดังนั้น Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร $1 \times 5 = 5 \text{ mL}$ แล้วเติมน้ำกลั่น $9 \times 5 = 45 \text{ mL}$

6% Na_2CO_3 (Sodium carbonate)

ชั่ง Na_2CO_3 30 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 mL

วิธีการคำนวณ

6% Na_2CO_3 หมายถึง

สารละลาย 1000 mL มี Na_2CO_3 อยู่ 60 g

สารละลาย 500 mL มี Na_2CO_3 อยู่ $\frac{500 \text{ mL} \times 60 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = 30 \text{ g}$

สารละลาย Gallic acid

เตรียม Gallic acid ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 25.00 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 mL มี Gallic acid 1×10^{-3} g

สารละลาย 25 mL มี Gallic acid $\frac{1 \times 10^{-3} \text{ g} \times 25 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.025 \text{ g}$

ดังนั้นจึง Gallic acid มา 0.025 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 25.00 mL ในขวดปรับปริมาตร

3. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)**5% NaNO₂**

ชั่ง NaNO₂ 1.0 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย NaNO₂ ปริมาตร 100 mL มีเนื้อ NaNO₂ 5 g

สารละลาย NaNO₂ ปริมาตร 20 mL มีเนื้อ NaNO₂ $\frac{5 \text{ g} \times 20 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 1.0 \text{ g}$

10% AlCl₃.6H₂O

ชั่ง AlCl₃.6H₂O 4 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 40 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 100 mL มีเนื้อ AlCl₃.6H₂O 10 g

สารละลาย 40 mL มีเนื้อ AlCl₃.6H₂O $\frac{10 \text{ g} \times 40 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 4 \text{ g}$

1 M NaOH

ชั่ง NaOH 4 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1000 mL มี NaOH ละลายอยู่ 1 mol

สารละลาย 100 mL มี NaOH ละลายอยู่ $\frac{100 \text{ mL} \times 1 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} = 0.1 \text{ mol}$

ทำเป็นกรัมจะได้ $0.1 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol} = 4 \text{ g}$

สารละลาย Rutin

เตรียม Rutin 2000 µg/mL ปริมาตร 100.00 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 mL มีเนื้อ Rutin อยู่ 2000×10^{-6} g

สารละลาย 100 mL มีเนื้อ Rutin อยู่ $\frac{2000 \times 10^{-6} \text{ g} \times 100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.2 \text{ g}$

ดังนั้น ชั่ง Rutin มา 0.2 g ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100.00 mL ในขวดปรับปริมาตร

4. การหาปริมาณโมโนเมอร์แอนโทไซยานิน (Total anthocyanins) โดยใช้วิธี pH differential method

pH 1.0 buffer (potassium chloride, 0.025M)

ชั่ง KCl 1.86 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 980 mL หลังจากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 1.0 (± 0.05) ด้วย HCl (ประมาณ 6.3 mL) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000.00 mL ในขวดปรับปริมาตร

pH 4.5 buffer (sodium acetate, 0.4M)

ชั่ง $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 54.43 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 960 mL หลังจากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 (± 0.05) ด้วย HCl (ประมาณ 20 mL) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000.00 mL ในขวดปรับปริมาตร

5. การหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Ferric reducing antioxidant power)

FRAP ซึ่งประกอบด้วย 300 mM Sodium acetate buffer ; pH 3.6

10 mM Iron reagent (TPTZ) ซึ่งละลายใน 40 mM HCl

20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

ผสมกันในอัตราส่วน 10:1:1 (Buffer:TPTZ: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (v/v/v)

10 mM iron reagent (TPTZ) (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ชั่ง 10 mM iron reagent (TPTZ) 0.0063 g ละลายด้วย 40 mM HCl ปริมาตร 2 mL

วิธีการคำนวณ

ความเข้มข้น 10 mM = 0.01 M หมายถึง

สารละลาย 1000 mL มี TPTZ ละลายอยู่ 0.01 mol

สารละลาย 2 mL มี TPTZ ละลายอยู่ $\frac{0.01 \text{ mol} \times 2 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol}$

ทำเป็นกรัมจะได้ $2 \times 10^{-5} \times 312.33 \text{ g/mol} = 0.0063 \text{ g} \dots\dots\dots(a)$

20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ชั่ง 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0108 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 2 mL

วิธีการคำนวณ

ความเข้มข้น 20 mM = 0.02 M หมายถึง

สารละลาย 1000 mL มี $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ละลายอยู่ 0.02 mol

สารละลาย 2 mL มี $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ละลายอยู่ $\frac{0.02 \text{ mol} \times 2 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 4 \times 10^{-5} \text{ mol}$

ทำเป็นกรัมจะได้ $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \times 269 \text{ g/mol} = 0.0108 \text{ g} \dots\dots\dots(b)$

หลังจากนั้น นำ (a)+(b) แล้ว เติม 300 mM acetate buffer; pH 3.6 ปริมาตร 20 mL

300 mM Acetate buffer pH 3.6 (ซึ่ง Acetate buffer คือ Acetic acid (CH_3COOH) กับ Sodium acetate (CH_3COONa))

ซึ่ง 0.02 M $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.36 g เติมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อย แล้วเปิด 0.28 M CH_3COOH ปริมาตร 8.04 mL หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 mL ด้วยขวดปรับปริมาตร

วิธีการคำนวณ

จาก $\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right)$

$$3.6 = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{CH}_3\text{COONa}]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} \right)$$

$$3.6 = 4.76 + \log \left(\frac{[\text{CH}_3\text{COONa}]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} \right)$$

$$-1.16 = \log \left(\frac{[\text{CH}_3\text{COONa}]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} \right)$$

$$10^{-1.16} = \frac{[\text{CH}_3\text{COONa}]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$0.069[\text{CH}_3\text{COOH}] = [\text{CH}_3\text{COONa}] \dots\dots\dots(1)$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] + [\text{CH}_3\text{COONa}] = 300 \text{ mM} = 0.3 \text{ M} \dots\dots\dots(2)$$

สมการ (1)+(2)

$$0.069[\text{CH}_3\text{COOH}] + [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.3 \text{ M}$$

$$1.069[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.3 \text{ M}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.28 \text{ M}$$

$$[\text{CH}_3\text{COONa}] = 0.3 \text{ M} - 0.28 \text{ M}$$

$$[\text{CH}_3\text{COONa}] = 0.02 \text{ M}$$

0.02 M $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

ซึ่ง 0.02 M $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.36 g ปรับปริมาตรให้ครบ 500 mL

วิธีการคำนวณ

ความเข้มข้น 0.02 M หมายถึง

สารละลาย 1000 mL มี $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ละลายอยู่ 0.02 mol

สารละลาย 500 mL มี $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ละลายอยู่ $\frac{0.02 \text{ mol} \times 500 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 0.01 \text{ mol}$

ทำเป็นกรัมจะได้ $0.01 \text{ mol} \times 136.08 \text{ g/mol} = 1.36 \text{ g}$

0.28 M CH₃COOH

เตรียม 0.28 M CH₃COOH 8.04 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 500 mL

วิธีการคำนวณ

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = \frac{10\%D}{\text{MW}}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = \frac{10(99.7)(1.049)}{60.05}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 17.42 \text{ M}$$

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(17.42 \text{ M})V_1 = (0.28 \text{ M})(500 \text{ mL})$$

$$V_1 = 8.04 \text{ mL}$$

40 mM HCl

เตรียม 40 mM HCl 3.32 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 mL

วิธีการคำนวณ

$$[\text{HCl}] = \frac{10\%D}{\text{MW}}$$

$$[\text{HCl}] = \frac{10(37)(1.19)}{36.5} = 12.06 \text{ M}$$

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(12.06 \text{ M})V_1 = (0.04 \text{ M})(1000 \text{ mL})$$

$$V_1 = 3.32 \text{ mL}$$

สารละลายมาตรฐาน FeSO₄·7H₂O

เตรียม Stock 10 mM FeSO₄·7H₂O ปริมาตร 25.00 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1000 mL มี FeSO₄·7H₂O ละลายอยู่ 0.01 mol

สารละลาย 25 mL มี FeSO₄·7H₂O ละลายอยู่ $\frac{0.01 \text{ mol} \times 25 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol}$

ทำเป็นกรัมจะได้ $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \times 278.01 \text{ g/mol} = 0.0695 \text{ g}$

ชั่ง 10 mM FeSO₄·7H₂O 0.0695 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 25.00 mL ในขวดปรับปริมาตร

6. การทดสอบการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-DPPH assay)

0.2 mM DPPH (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดสอบ)

ชั่ง DPPH 0.002 g ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 25 mL

วิธีการคำนวณ

ความเข้มข้น 0.2 mM หมายถึง

สารละลาย 1000 mL มี DPPH ละลายอยู่ 0.2×10^{-3} mol

สารละลาย 25 mL มี DPPH ละลายอยู่ $\frac{(0.2 \times 10^{-3} \text{ mol})(25 \text{ mL})}{(1000 \text{ mL})} = 5 \times 10^{-6}$ mol

ทำเป็นกรัมจะได้ $(5 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 394.32 \text{ g/mol}) = 1.97 \times 10^{-3} = 0.002$ g

สารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

เตรียม stock 1 mg/mL Ascorbic acid ปริมาตร 25.00 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 mL มีเนื้อ Ascorbic acid อยู่ 0.001 g

สารละลาย 25 mL มีเนื้อ Ascorbic acid อยู่ $\frac{0.001 \text{ g} \times 25 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.025$ g

ดังนั้นชั่ง Ascorbic acid มา 0.025 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 25.00 mL ในขวดปรับปริมาตร

7. DNA nicking assay

30 mM H₂O₂

เตรียม 30 mM H₂O₂ 0.023 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 mL

วิธีการคำนวณ

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{10\%D}{\text{MW}}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{10(30)(1.45)}{34.0147} = 12.788588 \text{ M}$$

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(12.79 \text{ M})V_1 = (0.03 \text{ M})(10 \text{ mL})$$

$$V_1 = 0.023 \text{ mL}$$

50 μ M Ascorbic acid

ชั่ง Ascorbic acid 0.0088 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1000 mL มี Ascorbic acid ละลายอยู่ 50×10^{-6} mol

สารละลาย 10 mL มี Ascorbic acid ละลายอยู่ $\frac{10 \text{ mL} \times 50 \times 10^{-6} \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} = 0.5 \times 10^{-6}$ mol

ทำเป็นกรัมจะได้ $0.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 176.12 \text{ g/mol} = 0.0088 \text{ g}$

80 μ M FeCl₃

ชั่ง FeCl₃ 0.0002 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1000 mL มี FeCl₃ ละลายอยู่ 80×10^{-6} mol

สารละลาย 10 mL มี FeCl₃ ละลายอยู่ $\frac{10 \text{ mL} \times 80 \times 10^{-6} \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} = 0.8 \times 10^{-6}$ mol

ทำเป็นกรัมจะได้ $0.8 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 270.30 \text{ g/mol} = 0.0002 \text{ g}$

1% Agarose gel

ชั่ง Agarose gel 0.5 g ละลายด้วย 1xTAE Buffer ปริมาตร 50 mL จากนั้นละลายเจลด้วยไมโครเวฟ เกล่งในสภาพเจลแล้วเสียบหัว รอจนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

1xTAE Buffer

ชั่ง Tris-base 242 g ละลายด้วย glacial acetic acid ปริมาตร 57.1 mL และเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 100 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 mL นำไป Autoclave ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

8. การหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (*In vitro* anti-inflammatory activity)

phosphate buffered saline (pH 6.4)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.25 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 mL แล้วปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 6.4 จากนั้นนำไป Autoclave ฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Diclofenac sodium

เตรียม stock 1 mg/mL Diclofenac sodium ปริมาตร 25.00 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 mL มีเนื้อ Diclofenac sodium อยู่ 0.001 g

สารละลาย 25 mL มีเนื้อ Diclofenac sodium อยู่ $\frac{0.001 \text{ g} \times 25 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.025 \text{ g}$

ดังนั้นจึง Diclofenac sodium มา 0.025 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 25.00 mL

ในขวดปรับปริมาตร

9. การทดสอบคุณสมบัติการต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียของมะม่วงหาวมะนาวโห่

การเตรียม Nutrient agar (NA)

จากสูตรอาหาร	Beef extract	3 g
	Peptone	5 g
	Agar	15 g
	น้ำกลั่น	1000 mL

การเตรียม NB ปริมาตร 600 mL

Beef extract

น้ำกลั่น 1000 mL ซึ่ง Beef extract 3 g

น้ำกลั่น 600 mL ซึ่ง Beef extract $\frac{3 \text{ g} \times 600 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 1.8 \text{ g}$

Peptone

น้ำกลั่น 1000 mL ซึ่ง Peptone 5 g

น้ำกลั่น 600 mL ซึ่ง Peptone $\frac{5 \text{ g} \times 600 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 3 \text{ g}$

Agar

น้ำกลั่น 1000 mL ซึ่ง Agar 15 g

น้ำกลั่น 600 mL ซึ่ง Agar $\frac{15 \text{ g} \times 600 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 9 \text{ g}$

ดังนั้น ในการเตรียมอาหาร NB ต้องซึ่ง Beef extract 1.8 g, Peptone 3 g และ Agar 9 g ละลายในน้ำกลั่น 600 mL คนด้วยแท่งแก้วโดยใช้ความร้อนในการช่วย ปิดจุกสำลีหุ้มฟอยด์ แล้วนำไป Cleave เพื่อฆ่าเชื้อ

10. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase activity)

Phosphate buffer (50 mM, pH 6.5)

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1000 mL มี KH_2PO_4 ละลายอยู่ 0.05 mol

สารละลาย 100 mL มี KH_2PO_4 ละลายอยู่ $\frac{10 \text{ mL} \times 0.05 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} = 5 \times 10^{-3} \text{ mol}$

ทำเป็นกรัมจะได้ $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 136.086 \text{ g/mol} = 0.68 \text{ g}$

ดังนั้นชั่ง KH_2PO_4 มา 0.68 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 mL ปรับ pH ด้วย KOH จนได้ pH 6.5 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 mL ในขวดปรับปริมาตร

Mushroom tyrosinase (333 unit/mL) (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

วิธีการคำนวณ

นำ Mushroom tyrosinase (25000 unit) ไปละลายใน Phosphate buffer ปริมาตร 1 mL จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้เป็น Mushroom tyrosinase (333 unit/mL)

12 mM L-DOPA (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

ชั่ง 12 mM L-DOPA 0.015 g ละลายด้วย Phosphate buffer ปริมาตร 6.5 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1000 mL มี L-DOPA ละลายอยู่ $12 \times 10^{-3} \text{ mol}$

สารละลาย 6.5 mL มี L-DOPA ละลายอยู่ $\frac{12 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 6.5 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} = 7.8 \times 10^{-5} \text{ mol}$

ทำเป็นกรัมจะได้ $7.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \times 197.19 \text{ g/mol} = 0.015 \text{ g}$

Kojic acid

เตรียม Stock 200 $\mu\text{g/mL}$ Kojic acid ปริมาตร 2 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 mL มีเนื้อ Kojic acid อยู่ $200 \times 10^{-6} \text{ g}$

สารละลาย 2 mL มีเนื้อ Kojic acid อยู่ $\frac{200 \times 10^{-6} \text{ g} \times 2 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.0004 \text{ g}$

ดังนั้นชั่ง Kojic acid มา 0.0004 g ปรับปริมาตรด้วย Phosphate buffer เป็น 2 mL

11. การหาปริมาณวิตามินซี (Total Vitamin C) โดยใช้ HPLC

2% Metaphosphoric acid

ชั่ง Metaphosphoric acid 2 g ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตร 100 mL

สารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

เตรียม Stock 1 mg/mL Ascorbic acid ปริมาตร 25.00 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 mL มีเนื้อ Ascorbic acid อยู่ 0.001 g

สารละลาย 25 mL มีเนื้อ Ascorbic acid อยู่ $\frac{0.001 \text{ g} \times 25 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.025 \text{ g}$

ดังนั้นชั่ง Ascorbic acid มา 0.025 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25.00 mL

0.1 M KH₂PO₄

ชั่ง KH₂PO₄ 13.609 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 mL

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1000 mL มี KH₂PO₄ อยู่ 0.1 mol

ทำเป็นกรัมจะได้ $0.1 \text{ mol} \times 136.09 \text{ g/mol} = 13.609 \text{ g}$

12. การหาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total Anthocyanins) โดยใช้ HPLC

0.1% HCl in MeOH

ปิเปต Conc. HCl 0.1 mL ปรับปริมาตรด้วย MeOH จนครบ 100 mL

Cyanidin-3-glucoside

วิธีการคำนวณ

นำ Cyanidin-3-glucoside (10 mg/mL) ไปละลายใน 0.1% HCl in MeOH ปริมาตร 1 mL

จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้เป็น Cyanidin-3-glucoside (1 mg/mL)

0.1% Aqueous formic acid

ปิเปต Conc. Formic acid 1 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้เป็น 1000 mL

Acetonitrile 0.1% formic acid

ปิเปต Conc. Formic acid 1 mL ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ให้เป็น 1000 mL

รายการอ้างอิง

- Alam, N., Yoo, K. N. and Lee, T. S. (2011). Evaluation of the antioxidant and antityrosinase activities of three extracts from *Pleurotus nebrodensis* fruiting bodies. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2978–2986.
- Albishi, T., John, J. A., Al-Khalif, A. S. and Shahidi, F. (2013). Antioxidant, antiinflammatory and DNA scission inhibitory activities of phenolic compounds in selected onion and potato varieties. *Journal of Functional Foods*, 5, 930–939.
- Almeida, M. L. B., Freitas, W. E. D. S., Morais, P. L. D. D., Sarmiento, J. D. A. and Alves, R. E. (2016). Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. *Food Chemistry*, 192, 1078–1082.
- Ames, B. M., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915–7922.
- Amira el, A., Behija, S. E., Beligh, M., Lamia, L., Manel, I., et al. (2012). Effects of the ripening stage on phenolic profile, phytochemical composition and antioxidant activity of date palm fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10896–10902.
- Anoop, M. V. and Bindu, A. R. (2015). In-vitro Anti-inflammatory Activity Studies on *Syzygium zeylanicum* (L.) DC Leaves. *International Journal of Pharma Research & Review*, 4(8), 18–27.
- AOAC, A. O. O. A. C. (2000). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 1410.
- Bain, J. M. (1958). Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Australian Journal of Botany*, 6, 1–23.
- Bakar, M. F. A., Mohamed, M., Rahmat, A. and Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*, 113(2), 479–483.
- Bast, A., Haeren, G. and Doelmen, C. (1991). Oxidants and antioxidants: state of art.

American Journal of Medicine, 91, 2-13.

- Benherlal, P. S. and Arumugan, C. (2008). Studies on modulation of DNA integrity in Fenton's system by phytochemicals. *Mutation Research*, 648(1-2), 1-8.
- 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.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A. (1998). *Jawetz, Melnick, and Adelberg's medical microbiology* (21st ed. ed.). Stamford: Appleton & Lange.
- Burt, S. (2004). Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods - A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Burton, G. W. and Traber, M. G. (1990). Vitamin E antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10, 357-382.
- Campanella, L., Lelo, D., Martini, E. and Tomassetti, M. (2007). Organophosphorus and carbamate pesticide analysis using an inhibition tyrosinase organic phase enzyme sensor; comparison by butyrylcholinesterase + choline oxidase opee and application to natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 587, 22-32.
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440-2475.
- Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B. D. (2008). Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Journal of research and education in indian medicine*, 127, 571-576.
- Chitarra, M. I. F. and Chitarra, A. B. (2005). *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio* (2a ed.). Lavras: UFLA (Capítulo 8). (2. ed. ed.). Lavras: Universidade Federal de Lavras.
- Choe, E. and Min, D. B. (2009). Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 345-358.
- Choi, Y. K., Rho, Y. K., Yoo, K. H., Lim, Y. Y., Li, K., et al. (2010). Effects of vitamin C vs. multivitamin on melanogenesis: comparative study *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Dermatology*, 49, 218-226.

- Cornelli, U. (2009). Antioxidant Use in Nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 175-194.
- Correia, L. F. M., Faraoni, A. S. and Pinheiro-Santana, H. M. (2008). Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. *Alimentos e Nutrição*, 19(1), 83-95.
- Denisov, E. T. and Afanas'ev, I. B. (2005). Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology.
- Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evan, C., et al. (1998). Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80, 77-112.
- do Nascimento, J. R. O., Júnior, A. V., Bassinello, P. Z., Cordenunsi, B. R., Mainardi, J. A., et al. (2006). Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 41-47.
- Dragsted, L. O. (2003). Antioxidant actions of polyphenols in humans. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73, 112-119.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Farooq, R. A., Khan, N. and Rahman, H. (2011). Fruit growth and development in three cultivars of citrus: orange, Kinnow and Feutrall's early. *FUFAST Journal of Biology*, 1, 145-147.
- Fawole, O. A. and Opara, U. L. (2013). Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. 'Bhagwa'). *South African Journal of Botany*, 85, 23-31.
- Fernandoa, I. D. N. S., Abeysinghea, D. C. and Dharmadasab, R. M. (2013). Determination of phenolic contents and antioxidant capacity of different parts of *Withania somnifera* (L.) Dunal from three different growth stages. *Industrial Crops and Products*, 50, 537-539.
- Frankel, E. N., Bosanek, C. A., Meyer, A. S., Silliman, K. and Kirk, L. L. (1998). Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 834-838.

- Fredes, C., Montenegro, G., Zoffoli, J. P., Gómez, M. and Robert, P. (2012). Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stuntz) during fruit development and maturation in Central Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72, 582–589.
- Gelssman, T. A. (1963). *Flavonoid compounds tannins lignins and related compounds*. New York, NY: Elsevier.
- Gordon, M. H. (2001). *The Development of Oxidative Rancidity in Foods*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31(4), 261-272.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 531-542.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J. and Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601-617.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Han, X., Shen, T. and Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 950-988.
- Hu, C. and Kitts, D. D. (2000). Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* root extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1466–1472.
- Huang, R., Xia, R., Hu, L., Lu, Y. and Wang, M. (2007). Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulturae*, 113(2), 166-172.
- Huang, X. H., Chen, Q. X., Wang, Q., Song, K. K., Wang, J., et al. (2006). Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acid. *Food Chemistry*, 94, 1-5.
- Imeh, U. and Khokhar, S. (2002). Distribution of Conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6301-6306.
- Jiménez, A. M., Sierra, C. A., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., et al. (2011). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*,

44(7), 1912-1918.

- Kameyama, K., Sakai, C., Kondoh, S. et al. (1996). Inhibitory effect of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34, 29–33.
- Kamlesh, P., Jale, R., Singh, M. and Kumar, R. (2010). Non-destructive evaluation of dimensional properties and physical characterization of *Carissa carandas* fruits. *International Journal of Emerging Sciences*, 2, 321-327.
- Kubola, J., Siriamornpun, S. and Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*, 126(3), 972-981.
- Kumar, S., Gupta, P. and Gupta K.L, V. (2013). A critical review on karamarda (*Carissa carandas* Linn.). *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(4), 637 - 642.
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P. and Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- Lauren, A. T. (2008). Antioxidant deficiencies in hospitalized dogs and cats. *Paper presented at the World Small Animal Veterinary Association*.
- Le Prell, C. G., Hughes, L. F. and Miller, J. M. (2007). Free radical scavengers, vitamins A, C, and E, plus magnesium reduces noise trauma. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(9), 1454-1463.
- Lee, J. C., Kim, H. R., KIM, J. and Jang, Y. S. (2002). Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6490-6496.
- Lee, Y. and Hwang, K. T. (2017). Changes in physicochemical properties of mulberry fruits (*Morus alba* L.) during ripening. *Scientia Horticulturae*, 217, 189-196.
- Lerner, A. B. and Fitzpatrick, T. B. (1950). Biochemistry of melanin formation. *Physiological Reviews*, 30, 91–126.
- Li, H., Horke, S. and Forstermann, U. (2013). Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(6), 313-319.
- Lin, Y. T., Labbe, R. G. and Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish

- and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5672-5678.
- Liu, H.,Cao, J. and Jiang, W. (2015). Evaluation of physiochemical and antioxidant activity changes during fruit on-tree ripening for the potential values of unripe peaches. *Scientia Horticulturae*, 193, 32-39.
- Lockwood, B. (2007). Nutraceuticals: A Guide for Healthcare Professionals. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71(5), 2-3.
- Manach, C.,Mazur, A. and Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Nutrition and metabolism*, MOL16111, 1-8.
- Momtaz, S.,Mapunya, B. M.,Houghton, P. J.,Edgerly, C.,Hussein, A., et al. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 507-512.
- Morelli, R.,Russo-Volpe, S.,Bruno, N. and Scalzo, R. L. (2003). Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7418–7425.
- Moyer, R. A.,Hummer, K. E.,Finn, C. E.,Frei, B. and Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins,phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus,and ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519–525.
- Nawar, W. W. (1996). "Lipid. In O. R. Fennema (eds.)". *Food Chemistry*, 210-243.
- Nimse, S. and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Nychas, G. and Tassou, C. (1999). Preservatives. Traditional Preservatives - Oils and Spices. *Oxford: Elsevier*.
- Oliveira, I.,Baptista, P.,Malheiro, R.,Casal, S.,Bento, A., et al. (2011). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(5), 1401-1407.
- Oroian, M. and Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Pajk, T.,Rezar, V.,Levart, A. and Salobir, J. (2006). Efficiency of apples, strawberries, and

- tomatoes for reduction of oxidative stress in pigs as a model for humans. *The Journal of Nutrition*, 22, 376–384.
- Pan, M. H., Ghai, G. and Ho, C. T. (2008). Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 43-52.
- Pelczar, M. J., Chan, E. D. S. and Krieg, N. R. (1998). *The control of microorganisms by physical agents*. New York, NY: McGraw-Hill International.
- Perluige, M., Demarco, F., Foppoli, C., Coccia, R., Blarzino, C., et al. (2003). Tyrosinase protects human melanocytes from ROS-generating compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 250–256.
- Perretti, G., Troilo, A., Bravi, E., Marconi, O., Galgano, F., et al. (2013). Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 177-182.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., et al. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137-150.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. and Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Pratt, D. E. and Hudson, B. J. F. (1990). *Natural antioxidants not exploited commercially Food Antioxidants*: Elsevier Science Publisher Ltd.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., et al. (1998). Antioxidant capacity influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686–2693.
- Puerta, T. (1999). Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 445-449.
- Ramirez, J. E., Zambrano, R., Sepulveda, B., Kennelly, E. J. and Simirgiotis, M. J. (2015). Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC-HR-ESI-ToF-MS. *Food Chemistry*, 176, 106-114.
- Ray, G., Batra, S., Shukla, N. K., Deo, S. and Raina, V. (2000). Lipid peroxidation, free radical

- production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 59, 163-170.
- Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive compounds of foods. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790-795.
- Río Segade, S., Soto Vázquez, E. and Díaz Losada, E. (2008). Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 599–607.
- Ros, J. R., Rodríguez-Lopez, J. N. and García-Canovas, F. (1993). Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochemical Journal*, 295, 309–312.
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A. and Saura-Calixto, J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, 20, 941-953.
- Sarma, A., Sarmah, P., Kashyap, D., Dutta, S. and Mahanta, M. (2015). Antioxidant Activity and Nutraceutical Property of the Fruits of an Ethno-Medicinal Plant: *Carissa carandas* L. found in Brahmaputra Valley Agro-Climatic Condition. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(2), 55-57.
- Schulz, M., Borges, G. D. S. C., Gonzaga, L. V., Seraglio, S. K. T., Olivo, I. S., et al. (2015). Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. *Food Research International*, 77, 125-131.
- Sergent, T., Piront, N., Meurice, J., Toussaint, O. and Schneider, Y. J. (2010). Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. *Chemico-Biological Interactions*, 188(3), 659-667.
- Shahidi, F. and Naczk, M. (2004). Phenolic in Food and Nutraceuticals. Boca Raton: CRC Press.
- Sharifi-Rad, J., Hoseini-Alfatemi, S. M., Sharifi-Rad, M. and Teixeira da Silva, J. A. (2015). Antibacterial, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory activities of crude extract from *Nitraria schoberi* fruits. *3 Biotech*, 5(5), 677-684.
- Shin, G. R., Lee, S., Lee, S., Do, S. G., Shin, E., et al. (2015). Maturity stage-specific

- metabolite profiling of *Cudrania tricuspidata* and its correlation with antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 70, 322-331.
- Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences*, 368, 7-19.
- Singh, A. and Uppal, G. K. (2015). A review on *Carissa carandas*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(3), 26-30.
- Sueprasarn, J., Pirak, T. and Riebroy, S. (2013). The Study of Optimal Condition for Anthocyanins Extraction from Karanda (*Carissa carandas* Linn.).
- Tadeo, F. R., Moya, J. L., Iglesias, D. J., Talón, M. and Primo-millo, E. (2003). *Histología y citología de cítricos*.
- Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., et al. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 525-533.
- Tian, B., Xu, Z., Sun, Z., Lin, J. and Hua, Y. (2007). Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 902-911.
- Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M. S., Ilahy, R., Jebari, H., et al. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 923-928.
- Ullah, H. M. A., Zaman, S., Juhara, F., Akter, L., Tareq, S. M., et al. (2014). Evaluation of antinociceptive, *in-vivo* & *in-vitro* anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14, 346-358.
- Valacchi, G. et al. (2004). *In vivo* ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 673-681.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.

- Verma, S. and Chaudhary, H. S. (2011). Effect of *Carissa carandas* against Clinically Pathogenic bacterial strains. *Journal of Pharmacy Research*, 4(10), 769-3771.
- Vermerris, W. and Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Netherlands: Springer.
- Wrolstad, R. E.,Durst, R. W. and Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423-428.
- Zafar, Z.,Talkad, M. S.,Bandopadhyay, C.,Sinha, M. and Sarkhel, J. (2011). Antioxidant activity of five selective medicinal plants. *African journal of science and research*, 2, 126 147.
- Zainudin, M. A. M.,Hamid, A. A.,Anwar, F.,Osman, A. and Saari, N. (2014). Variation of bioactive compounds and antioxidant activity of carambola (*Averrhoa carambola* L.) fruit at different ripening stages. *Scientia Horticulturae*, 172, 325-331.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(3).
- วชิราภรณ์ ฝิวล่อง,สุรศักดิ์ สัจจบุต,ศิริลักษณ์ สิงห์เพชร และ จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ. (2556). อิทธิพลของระยะเวลาสุกต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร, 44(2), 337-340.
- อัญชญา เจนวิถีสุข. (2544). การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทัตพิชา กายเย็น
วัน เดือน ปี เกิด	20 ก.พ. 2536
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร (พ.ศ. 2558)
ที่อยู่ปัจจุบัน	9/17 ม.3 ต.ห้วยจรเข้ม อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
ผลงานตีพิมพ์	Kayyen, T. and Phongtongpasuk, S. (2017). Effect of maturation stage on chemical changes and biological properties of <i>Carissa carandas</i> , The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand, p 398-405.

