

คุณสมบัติของสารสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเซตจากมะรุมต่อความสามารถ
ในการต้านออกซิเดชัน

PROPERTY OF EXTRACTS AND PROTEIN HYDROLYSATE FROM
MORINGA OLEIFERA ON ANTIOXIDANT ACTIVITY

อุกฤษฏ์ มากศรทรง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

คุณสมบัติของสารสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเซตจากมะรุมต่อ
ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

อุกฤษฏ์ มากศรทรง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติของสารสกัดและโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุมต่อความสามารถใน
การต้านออกซิเดชัน
Property of Extracts and Protein Hydrolysate from *Moringa*
oleifera on Antioxidant Activity


ชื่อ - นามสกุล นายอุกฤต มากศรทรง


สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์นวพร ลาภส่งผล, วท.ด.


ปีการศึกษา 2562

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทชนก นันทะไชย, ปร.ด.)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาลิดา ตั้งอนุรัตน์, ปร.ด.)

นพพร ลาภส่งผล
..... กรรมการ
(อาจารย์นวพร ลาภส่งผล, วท.ด.)


..... กรรมการ
(อาจารย์นัทธิวรรณ อุดมศิลป์, วท.ด.)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

S. Salita
..... คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
(อาจารย์ลลิตา ศิริวัฒนานนท์, Ph.D.)

วันที่ 17 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2562

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติของสารสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุมต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชัน
ชื่อ - นามสกุล	นายอุกฤษฏ มากศรทรง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์นภาพร ลาภส่งผล, วท.ด.
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆของมะรุม (ใบ เมล็ด เปลือก และเนื้อมะรุม) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำ เอทานอลเข้มข้น 50 และ 95% 2) ศึกษาผลของชนิดเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจากใบมะรุมด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส การวิเคราะห์ค่าระดับการย่อยสลาย และศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก 3) ศึกษาความคงตัวของอนุมูลอิสระ และค่าความเป็นกรดต่างของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของมะรุม พบว่า ใบมะรุมมีค่าปริมาณโปรตีนสูงสุดคิดเป็น 30.56 % ซึ่งสูงกว่า เมล็ด เปลือก และเนื้อมะรุม ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากมะรุม พบว่าเปลือกมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS สูงที่สุดคิดเป็น 13.81 mg gallic acid eq./g, 17.51 mg Trolox eq./g และ 42.97 mg Trolox eq./g ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% และเนื้อมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% มีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก และความสามารถในการจับโลหะสูงที่สุดคิดเป็น 0.59 mg ferrous eq./g และ 4.31 µg EDTA eq./g ตามลำดับ

ผลของการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส พบว่าการใช้เอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนจากใบมะรุมได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์นิวเทรส ซึ่งพบว่ามีการย่อยสลายที่เวลา 8 ชั่วโมง คิดเป็น 68.95 และ 20.99% ตามลำดับ โปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงแสดงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก และความสามารถในการจับโลหะได้ดีที่สุดคิดเป็น 13.96 mg Trolox eq./g, 97.60 mg Trolox eq./g, 0.34 mg ferrous eq./g และ 28.87 µg EDTA eq./g. ตามลำดับ ผลของการศึกษาความคงตัวของอนุมูลอิสระ และค่าความเป็นกรดต่างต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุม พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความคงตัวของอนุมูลอิสระและค่าความเป็นกรดต่างต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างหลากหลาย

คำสำคัญ : มะรุม การสกัดด้วยตัวทำละลาย โปรตีนไฮโดรไลเซต สารต้านออกซิเดชัน



Thesis Title	Property of Extracts and Protein Hydrolysate from <i>Moringa oleifera</i> on Antioxidant Activity
Name-Surname	Mr. Ukit Maksonsong
Program	Food Technology
Thesis Advisor	Ms. Nawaporn Lapsongphon, Ph.D.
Academic Year	2019

ABSTRACT

The objectives of this research were to: 1) analyze the chemical compositions of Moringa (*Moringa oleifera*) (leaf, seed, peel, and pulp), total phenolic content, and antioxidant activity in Moringa extracted with water, 50% and 95% ethanol, 2) study the effect of enzyme types for hydrolysing protein from Moringa leaf with Alcalase and Neutrase, degree of hydrolysis, and antioxidant activity, and 3) study the stability of the thermal and pH of hydrolysate protein from Moringa leaf on antioxidant activity.

The chemical composition analysis of Moringa (*Moringa oleifera*) indicated that Moringa leaves had the highest protein content of 30.56%, which was higher than seeds, peel, and pulp, respectively. The analysis of total phenolic content and antioxidant activity showed that Moringa peel extracted with 50% ethanol yielded the highest total phenolic content, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS) and radical scavenging activities of 13.81 mg gallic acid eq./g, 17.51 mg Trolox eq./g and 42.97 mg Trolox eq./g, respectively. In addition, Moringa leaves extracted by 50% ethanol and its pulp extracted by 95% ethanol had ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the highest metal chelating activity of 0.59 mg ferrous eq./g and 4.31 µg EDTA eq./g, respectively.

Antioxidant peptides of Moringa leaf hydrolyzed by Alcalase and Neutrase showed that Alcalase could hydrolyze Moringa leaf proteins better than Neutrase. Degree of hydrolysis of Alcalase-hydrolyzed Moringa leaf and Neutrase-hydrolyzed sample for 8 hours showed 68.95% and 20.99%, respectively. Alcalase-hydrolyzed Moringa leaf (at 8 hour hydrolysis) exhibited the highest antioxidant activity of DPPH, ABTS, FRAP, and metal chelating activity of 13.96 mg Trolox eq./g, 97.60 mg Trolox eq./g, 0.34 mg ferrous eq./g and 28.87 µg EDTA eq./g, respectively. The results of thermal and pH of hydrolyzed Moringa leaf showed that protein hydrolyzed from Moringa leaf extracted by Alcalase had stability on temperature and pH and on

antioxidant activity of DPPH and ABTS, which could be used in various food industrial applications.

Keywords: *Moringa oleifera*, solvent extraction, protein hydrolysate, antioxidant activity



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความเมตตา และช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ อาจารย์นภาพร ลากส่งผล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาเสียสละเวลาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ให้ความรู้ แก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัย ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนเป็นกำลังใจ และให้ความหวังใจด้วยดีเสมอมา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทชนก นันทะไชย ประธานกรรมการสอบ และกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาไลดา ตั้งอนุรัตน์ และอาจารย์นทีวีวรรณ อุดมศิลป์ ที่ได้ให้ความกรุณาในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัย รวมทั้ง เสียสละเวลาในการเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย รวมทั้งให้คำแนะนำ ความหวังใจ และให้กำลังใจในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ ทั้งทางด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ รวมทั้งให้กำลังใจ และคำแนะนำในการปฏิบัติงาน

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้ซึ่งคอยห่วงใย ให้กำลังใจ ให้โอกาส และทุนในการศึกษา อันมีค่ายิ่ง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในงาน หากวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ขาดตกบกพร่อง หรือมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

อุกฤต มากศรทรง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
สารบัญตาราง.....	(10)
สารบัญรูป.....	(13)
บทที่ 1 บทนำ.....	16
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	16
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	17
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	17
1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	17
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	17
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
2.1 มะรุม.....	18
2.2 โพรตีน.....	20
2.3 โพรตีนไฮโดรไลเซต.....	25
2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	28
2.5 การออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	30
2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	32
2.7 วิธีวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน.....	41
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	47
3.1 วัตถุประสงค์ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	47
3.2 วิธีการทดลอง.....	49
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	52
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	52

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	53
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมะรุม การหาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด และการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันจาก ส่วนต่างๆของมะรุมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	53
4.2 การศึกษาชนิดของเอนไซม์ในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ทาง การค้า การวิเคราะห์ค่าระดับการย่อยสลาย และศึกษาการวิเคราะห์โปรตีน จาก ใบมะรุม	59
4.3 การศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิ และpH.....	68
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	71
บรรณานุกรม.....	72
ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก	
ตอนที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของส่วน ต่างๆจากมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	84
ตอนที่ 2 การศึกษาระดับการย่อยสลาย มาตรฐานโปรตีน การวิเคราะห์ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ของส่วนต่างๆ จากมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ นิวเทรส.....	102
ประวัติผู้เขียน.....	120

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่างๆของมะรุม.....	53
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจาก ใบ เปลือก เนื้อ และเมล็ดมะรุม.....	54
ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จาก ใบ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม.....	55
ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จาก ใบ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม.....	56
ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จาก ใบ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม.....	57
ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการแย่งจับ Fe^{2+} ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จาก ใบ เมล็ด เนื้อและเปลือกมะรุม.....	58
ตารางที่ ก.1 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	88
ตารางที่ ก.2 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากส่วนต่างๆ ของ มะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	89
ตารางที่ ก.3 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	91
ตารางที่ ก.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จาก ส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	92
ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous Sulphate ในการหาความสามารถในการรีดิวซ์ เหล็กเฟอร์ริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่ สกัดด้วยตัวทำละลาย ต่างๆ.....	94
ตารางที่ ก.6 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก จากส่วน ต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	95

สารบัญตาราง(ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงของ EDTA ในการหาความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	96
ตารางที่ ก.8 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	97
ตารางที่ ก.9 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	99
ตารางที่ ก.10 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	100
ตารางที่ ก.11 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ L-Leucine.....	103
ตารางที่ ก.12 ผลค่าการดูดกลืนแสงของค่าระดับการย่อยสลายจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	104
ตารางที่ ก.13 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Bovine serum albumin	105
ตารางที่ ก.14 ผลค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	106
ตารางที่ ก.15 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและนิวเทรส.....	107
ตารางที่ ก.16 ผลค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	108
ตารางที่ ก.17 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	110
ตารางที่ ก.18 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	111

สารบัญตาราง(ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ ก.19 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous Sulphate ในการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วย เอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	112
ตารางที่ ก.20 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์นิวเทรส.....	113
ตารางที่ ก.21 ค่าการดูดกลืนแสงของ EDTA ในการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	115
ตารางที่ ก.22 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์นิวเทรส.....	116
ตารางที่ ก.23 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	117
ตารางที่ ก.24 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์นิวเทรส.....	118



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ α -tocopherol	35
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์.....	37
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างเคมีของ BHA (2-tert-butyl-4-hydroxyanisole และ 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole)	38
ภาพที่ 2.4 การเปลี่ยนอนุมูล DPPH ภายหลังเกิดปฏิกิริยารีดักชัน และมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วง เป็นสีเหลือง.....	43
ภาพที่ 2.5 การเกิดปฏิกิริยาของ $ABTS^{\cdot-}$ กับสารต้านออกซิเดชัน และการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 734 นาโนเมตร เพื่อการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน	44
ภาพที่ 2.6 การทำปฏิกิริยาระหว่าง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{3+}$ กับสารต้านออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยนเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่สามารถติดตามวัดการเปลี่ยนสีที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร.....	46
ภาพที่ 2.7 กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	46
ภาพที่ 4.1 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากไบโमेรุ่มด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ	59
ภาพที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโमेรุ่มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส	61
ภาพที่ 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโमेรุ่มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ...	62
ภาพที่ 4.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระDPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโเมรุ่มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ.....	63
ภาพที่ 4.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโเมรุ่มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ	64

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 4.6 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	66
ภาพที่ 4.7 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี Metal chelating activity assay.....	67
ภาพที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ด้วยวิธี DPPH และ ABTS	68
ภาพที่ 4.9 ผลของ pH ต่อความคงตัวของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส วิเคราะห์ด้วย วิธี DPPH และ ABTS.....	69
ภาพที่ ก.1 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Gallic acid กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Gallic acid ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	89
ภาพที่ ก.2 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	91
ภาพที่ ก.3 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Ferrous Sulphate ในการหาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่ สกัดด้วยตัวทำละลาย ต่างๆ.....	94
ภาพที่ ก.4 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน EDTA ในการหาสามารถ ในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจาก ส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	97
ภาพที่ ก.5 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ.....	99

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ ก.6 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน L-leucine	104
ภาพที่ ก.7 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA).....	106
ภาพที่ ก.8 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Gallic acidในการหาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์ อัลคาเลส และนิวเทรส	108
ภาพที่ ก.9 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้าน อนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วย เอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	110
ภาพที่ ก.10 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Ferrous Sulphate ในการวิเคราะห์ ความสามารถในการ รีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่ สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และ นิวเทรส.....	113
ภาพที่ ก.11 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน EDTA ในการวิเคราะห์ความสามารถในการ แย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์ อัลคาเลส และนิวเทรส.....	115
ภาพที่ ก.12 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้าน อนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่ สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส.....	118

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะรุม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่พบมากในประเทศไทยและประเทศในเขตร้อน มีประโยชน์สามารถนำมารับประทานได้หลายส่วนทำให้มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมมากขึ้นทั้งทางด้านอาหาร ยา เครื่องสำอาง และสิ่งทอ เป็นต้น จากงานวิจัยพบว่าใบมะรุมและมะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ลดความดันเลือด ลดคอเลสเตอรอล ลดระดับน้ำตาล ต้านเชื้อแบคทีเรีย และรา และต้านมะเร็ง งานวิจัยส่วนใหญ่ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากใบมะรุม เช่น ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำมันมะรุมซึ่งมีส่วนประกอบของ tocopherols [1] และความสามารถในการต้านออกซิเดชันสารสกัดจากใบมะรุม [2], [3] ซึ่งใบมะรุมถือว่ามีปริมาณโพลีฟีนอลที่สำคัญสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นอุดมไปด้วยเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารสีตามธรรมชาติ เป็นแหล่งของกรดไขมัน และกรดอะมิโนจำเป็นที่สำคัญหลายชนิดที่จำเป็นต่อร่างกาย [4], [5] ซึ่งงานวิจัยของ Jongrungruangchok et al. (2010) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐาน และแร่ธาตุในใบมะรุมที่ปลูกในประเทศไทยจากทั้งหมด 11 จังหวัด จากผลการวิเคราะห์พบว่าองค์ประกอบที่พบมากที่สุดคือโปรตีนคิดเป็น 19.15-28.80%, ไขมันคิดเป็น 2.06-2.47%, คาร์โบไฮเดรตคิดเป็น 16.30-23.89%, และความชื้นคิดเป็น 8.52-13.53% [6] ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าว จะเห็นได้ว่าใบมะรุมมีปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนสำหรับมนุษย์หรือเป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติได้

โปรตีนจากพืชผักได้จากเมล็ดพืชน้ำมัน เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ทานตะวัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพืชที่สามารถผลิตได้ในประเทศ และปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซตอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในวงการอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่เหมาะสมจะนำมาเป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติในด้านการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากสามารถนำมาทดแทนสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบสังเคราะห์เช่น propyl gallate (PG), 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene (BHT) และ tertiary butylhydroquinone ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ได้

สำหรับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากมะรุม และความสามารถในการต้านออกซิเดชันค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากมะรุมด้วยเอนไซม์ทางการค้าต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมถึงความคงตัวของอุณหภูมิและ pH ต่างๆ ซึ่งผลจากงานวิจัยดังกล่าวจะเป็นแนวทางหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการสร้างองค์ความรู้ และความเข้าใจในการใช้ประโยชน์ของโปรตีนจากพืชได้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่างๆจากมะรุม
- 1.2.2 เพื่อศึกษาตัวทำละลายในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆของมะรุม
- 1.2.3 เพื่อศึกษากลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุม
- 1.2.4 เพื่อศึกษาชนิดของเอนไซม์ในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ทางการค้า
- 1.2.5 เพื่อศึกษาความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมต่ออุณหภูมิ และ pH ต่างๆ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากมะรุม ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า เส้นใย และคาร์โบไฮเดรต
- 1.3.2 ศึกษาการสกัดสารจากส่วนต่างๆของมะรุม ด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล เข้มข้น 50 และ 95%
- 1.3.3 ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุม ด้วยการทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระ ABTS การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก และทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับโลหะไอออน Fe^{2+}
- 1.3.4 ศึกษาผลของชนิดเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์นิวเทรส ค่าระดับการย่อยสลายต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุม
- 1.3.5 ศึกษาความคงตัวของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่อุณหภูมิ 25, 37, 50, 60, 70, 80, 90, 100 และ 121 องศาเซลเซียส และ pH 4, 7 และ 10 เป็นเวลา 30 นาที

1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย

ใบมะรุมเป็นพืชที่มีประโยชน์ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายจากรายงานการศึกษาพบว่า องค์ประกอบที่พบมากที่สุด ใบมะรุมคือโปรตีน อีกทั้งยังมีรายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนต่างๆมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และตำแหน่งของกรดอะมิโนในสายโปรตีน ค่าระดับการย่อยสลาย และเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับใบมะรุม และเป็นการสร้างองค์ความรู้เพื่อพัฒนาต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 เพิ่มมูลค่าให้แก่ใบมะรุม เป็นเป็นการเพิ่มทางเลือกที่สามารถนำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมในอาหารต่างๆได้
- 1.5.2 ได้ทราบถึงวิธีการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซท และวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะรุม

มะรุม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa Oleifera* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ *Moringaceae* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 15-20 เมตร ลำต้นเป็นพุ่มโปร่ง เนื้อไม้อ่อน มะรุม เป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบเอเชีย เช่น อินเดีย ศรีลังกา เป็นต้น และยังมีในเขตเอเชียไมเนอร์ และแอฟริกา เป็นไม้ปลูกง่าย เจริญได้ดีในดินทุกชนิด ต้องการน้ำ และความชื้นในปริมาณปานกลาง ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด และการปักชำกิ่ง งอกเร็ว มะรุมเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมนำมาใช้ในขณะนี้ เนื่องจากมี ประโยชน์สามารถนำมารับประทานได้หลายส่วน ได้แก่ ยอด ดอก ฝักเขียว เมล็ด ราก จากงานวิจัยพบว่าใบมะรุม และมะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ใช้ถอนพิษไข้ แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้ท้องเสีย แก้แผล ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ขับปัสสาวะ ป้องกันมะเร็ง ลดความดันโลหิต ลดน้ำตาลในเลือด ความสามารถต้านออกซิเดชัน [1], [7], [8], [9]

2.1.1 รูปแบบ และการนำไปใช้ทางด้านยารักษาโรคของ ใบ ผล ดอก และเมล็ดของมะรุม

2.2.1.1 ใบมะรุม จะเป็นใบประกอบเหมือนขนนก ลักษณะใบจะแตกใบย่อยเป็น 3 ชั้น มีความยาว 20-40 ซม. เรียงกันแบบสลับ ส่วนของใบย่อยจะมีความยาวประมาณ 1-3 ซม. ลักษณะปลายเป็นรูปไข่ และฐานของใบ มีลักษณะมน ผิวใบบริเวณด้านล่าง จะมีสีอ่อนกว่าด้านบน ขณะที่ใบยังอ่อนจะมีขนเล็กน้อย รสชาติใบจะมีรสหวาน [5] ใบมะรุมสดใช้กินเป็นอาหาร ส่วนใบแห้งที่ทำเป็นผงเก็บไว้ได้นานโดยยังมีคุณค่าทางอาหารสูง ใบมะรุมมีวิตามินเอ ที่สูงกว่าแครอท มีแคลเซียมสูงกว่านม มีเหล็กสูงกว่าผักขม มีวิตามินซีสูงกว่าส้ม และมีโปแตสเซียมสูงกว่ากล้วย ใบมะรุมจะมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก ฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็ง ฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอล ฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านหรือคลายการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ควบคุมฮอร์โมนต่อมไทรอยด์ ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาล ฤทธิ์เปลี่ยนแปลงพฤติกรรม ฤทธิ์ทำให้เกิดการแท้ง ฤทธิ์สมานแผล และฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด สารสำคัญที่ประกอบด้วยสารต้านออกซิเดชันชนิดต่างๆ เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ฟีนอลิก (Phenolic) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เบต้าซิโตสเตอรอล (Beta-sitosterol) เหล็ก แคลเซียม ทองแดง วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี วิตามินอี (Alpha-tocopherol) วิตามินบี2 (Riboflavin) โปรตีน และกรดอะมิโนจำเป็น ตัวอย่างเช่น เมไทโอนีน (Methionine) ซิสเตอีน (Cysteine) ทริптоเฟน (Tryptophan) ไลซีน (Lysine) ไนไตรล์ (Nitrile) ไกลโคไซด์ (Glycosides) โดยที่สารประกอบส่วนใหญ่ที่มีกลุ่มของ Thiocarbamate carbamate หรือ nitrile จะเป็นชนิดที่มีกลุ่ม acetyl ซึ่งเป็นลักษณะที่หายากในธรรมชาติ สารกลุ่ม thiocarbamate คือ niazinin A, niazinin B, niazimicin, niaciminin A, niaciminin B สารกลุ่ม carbamate คือ niazirimin A, niazirimin B, niazicin A, niazicin B และ 4-((4'-O-Acetyl-Alpha-L-Rhamnosyloxy)Benzyl) isothiocyanate

อติกา และคณะ (2555) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยเอทานอล ต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว พบว่าสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 3 mg/mL และสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 3 mg/mL มีฤทธิ์เพิ่มการสลายไขมัน[10]

Pamok et al. (2012) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 สามารถยับยั้งการแบ่งตัว (proliferation) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HCT15 SW48 และ SW480 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 264.83±23.33, 102.40±16.08 และ 197.20±32.52 µg/mL ตามลำดับ [11]

Tragulpakseerojn et al. (2016) การศึกษาสารที่สกัดจากใบมะรุมแห้งด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 (1:10 w/v) พบว่าสารที่สำคัญสองตัวหลักที่พบในสารสกัดได้แก่ กรดคลอโรจินิก (Chlorogenic acid) และแอสตรากาลิน (Astragaloside) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ได้ [12]

2.2.1.2 ผลมะรุม มีลักษณะเป็นฝักยาว มีเปลือกเป็นสีเขียว และมีส่วนคอด ส่วนมนเป็นช่วงๆ ตามความยาวฝัก ฝักปกติจะยาวประมาณ 20-50 ซม. ฝักจะมีรสชาติหวาน ผลฝักมะรุมจะมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต และฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอล

2.2.1.3 ดอกมะรุม จะออกในช่วงฤดูหนาว บางพันธุ์จะมีลักษณะเด่นคือ สามารถออกดอกได้หลายครั้งต่อรอบปี ดอกมีลักษณะเป็นช่อขาว มีกลีบเรียงกันทั้งหมด 5 กลีบแยกกัน รสชาติดอกมีความขม มันเล็กน้อย ดอกมะรุมจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันมะเร็ง ป้องกันตับอักเสบ, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา และฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร

2.2.1.4 เมล็ดมะรุม เป็นรูปเรขาคณิต 3 เหลี่ยม มีปีกซึ่งมีความบางหุ้มอยู่ 3 ปีก เส้นผ่านศูนย์กลางเมล็ด มีความยาวประมาณ 1 ซม. เมล็ดมะรุมจะมีฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก และต้านการเกิดมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ฤทธิ์ขับปัสสาวะ ฤทธิ์ต้านการหดเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ ฤทธิ์ลดความดันโลหิต และฤทธิ์ยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งชนิดรุนแรงแบบทั่วร่างกาย และแบบเฉพาะที่ (Systemic และ Local anaphylaxis)

2.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมะรุม

Yaméogo et al. (2011) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนาการของใบมะรุมสด และแห้งจากมะรุมที่ปลูกในแหล่งต่างๆ 3 แหล่งในเมืองวากาดูกู ประเทศบูร์กินาฟาโซ ได้แก่ แหล่ง 4 แหล่ง 13 และแหล่ง 26 จากการวิเคราะห์พบว่าใบมะรุมสดจากแหล่ง 4 มีปริมาณความชื้น และโปรตีนมากที่สุด เท่ากับ 74.5±0.1 และ 13.6±0.1 กรัม/100 กรัม สารตั้งต้น ตามลำดับ ใบมะรุมสดจากแหล่ง 13 มีปริมาณไขมัน เยื่อใย และพลังงานมากที่สุด เท่ากับ 1.7±0.0, 4.5±0.0 กรัม/100 กรัม สารตั้งต้น และ 95.4 Kcal ตามลำดับ และใบมะรุมสดจากแหล่ง 26 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด เท่ากับ 11.3±0.0 กรัม/100 กรัม สารตั้งต้น นอกจากนี้ใบมะรุมแห้งจากแหล่ง 13 มีปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเยื่อใยมากที่สุด เท่ากับ 27.6±0.9, 21.6±0.3, 22.3±0.3 กรัม/100 กรัม สารตั้งต้น และ 362.4 Kcal ตามลำดับ และใบมะรุมแห้งจากแหล่ง 26 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด เท่ากับ 43.3±0.1 กรัม/100 กรัม สารตั้งต้น [13]

Compaoré et al. (2011) วิจัยเกี่ยวกับการหาองค์ประกอบทางเคมี และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเมล็ดมะรุมี (*Moringa oleifera*) และเปลือกของถั่วโลคัสต์ (*Parkia biglobosa*) และเปลือกของบาวบับ (*Adansonia digitata*) จากการวิจัยพบว่าเมล็ดมะรุมี ปริมาณโปรตีน และไขมันมากที่สุด เท่ากับ 35.37 ± 0.07 และ 43.56 ± 0.03 กรัม/100 กรัม สารตั้งต้น ตามลำดับ ในขณะที่เปลือกของถั่วโลคัสต์ และเปลือกของบาวบับมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด เท่ากับ 67.8 ± 0.05 และ 67.66 ± 0.05 กรัม/100 กรัม สารตั้งต้น ตามลำดับ ซึ่งคาร์โบไฮเดรตที่พบใน เมล็ดมะรุมี เปลือกถั่วโลคัสต์ และเปลือกของบาวบับ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรักโทส ซูโครส นอกจากนี้พบว่าเมล็ดมะรุมีปริมาณโปรแอนโทไซยานิน และฟลาโวนอยด์มากที่สุด ในขณะที่เปลือกถั่ว โลคัสต์ และเปลือกของบาวบับมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด และเมล็ดมะรุมีมีความสามารถ ในการต้านออกซิเดชัน (99.74%) มากกว่าเปลือกถั่วโลคัสต์ และเปลือกของบาวบับ (94.98% และ 79.40% ตามลำดับ) [14]

Amabye (2016) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และคุณค่าทางโภชนาการของใบ มะรุมีแห้งจากตลาด mekelle ตามมาตรฐาน the association of official analytical chemists [16] โดยปริมาณโปรตีนวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl ปริมาณเยื่อใยวิเคราะห์จากวิธีการย่อย (Digestion) และไขมันวิเคราะห์ด้วยวิธีการสกัดเครื่องสกัดแบบซอกเลต (Soxhlet extraction) จากการวิเคราะห์ พบว่าใบมะรุมีปริมาณความชื้นประมาณ 3.06-3.34% ปริมาณไขมันประมาณ 10.21-10.31% ปริมาณเยื่อใย ประมาณ 7.29-9.46% ปริมาณเถ้าประมาณ 10.71-11.18% ปริมาณโปรตีนประมาณ 10.74-11.48% และปริมาณคาร์โบไฮเดรตประมาณ 54.61-57.61% [15]

2.2 โปรตีน (Protein)

โปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยปกติแล้วโปรตีนจะมี องค์ประกอบของธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน เป็นส่วนประกอบในปริมาณมาก ส่วนธาตุที่ประกอบในปริมาณน้อยได้แก่ กำมะถัน ฟอสฟอรัส เหล็ก [17] นอกจากนี้โปรตีนเป็น สารประกอบอินทรีย์ที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ที่เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องของระบบการทำงานของเซลล์รวมทั้งเป็นระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต โปรตีนสามารถพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด สัตว์ต้องการใช้โปรตีนตลอดชีวิต เพื่อใช้ในการ เจริญเติบโต และซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอหรือที่สัตว์ยังต้องการโปรตีนเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของเลือด เนื้อ เอนไซม์ (Enzyme) ภูมิคุ้มกัน (Immune) และฮอร์โมน (Hormone) และยังสามารถนำไปสร้างผลผลิตเพื่อ การสืบพันธุ์ ซึ่งในสัตว์ต่างชนิดกัน โปรตีนจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ทั้งนี้ในเซลล์ และ เนื้อเยื่อของ สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว พบว่าโปรตีนจะมีความแตกต่าง และมีความหลากหลายมาก โปรตีน สามารถพบในธรรมชาติได้ [18], [19] การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเคห์ดาห์ลมักจะต้องตั้งสมมุติฐาน ว่าโปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจนร้อยละ 16 และหน่วยที่เล็กที่สุดของโปรตีนคือ กรดอะมิโน

กรดอะมิโน เป็นโปรตีนมีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาวใน พอลิเปปไทด์ที่ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ กรดอะมิโนเป็นหน่วยพื้นฐานของโปรตีนหรือโมโนเมอร์ของ โปรตีน พบว่าส่วนใหญ่โปรตีนจะประกอบไปด้วยด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด และกรดอะมิโนยังทำหน้าที่

เป็นหน่วยโครงสร้างของโปรตีน (Binding block) ซึ่งโปรตีนที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะ และคุณสมบัติที่แตกต่างกันไป ขึ้นกับคุณสมบัติของกรดอะมิโนในแต่ละชนิด และแต่ละตัวในสายพอลิเพปไทด์นั้นๆแล้วยังเป็นตัวส่งสัญญาณเคมีในการติดต่อกันระหว่างเซลล์ เช่น ส่งสัญญาณประสาท

เพปไทด์ เป็นสารประกอบที่เกิดจากการจับตัวกันของกรดอะมิโนตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปโดยใช้พันธะเพปไทด์ (Peptide bond) หรือ เอไมด์ และเพปไทด์ยังเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนซึ่งได้จากหมู่เอมิโนของกรดอะมิโนโมเลกุลที่หนึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนโมเลกุลที่สอง และสูญเสียน้ำไปหนึ่งโมเลกุล พันธะที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนทั้งสองโมเลกุลเป็นพันธะโควาเลนต์ ระหว่างคาร์บอน และไนโตรเจนเรียกว่า พันธะเพปไทด์ เพปไทด์บางชนิดให้รสขม เช่น รสขมที่ได้จากการไฮโดรไลซิสโปรตีนในเนยแข็งที่ป่มไม่ดี เพปไทด์บางชนิดให้รสหวาน เช่น เพปไทด์ของกรดแอสพาร์ติก และอะลานีนเมทิลเอสเทอร์ จึงถูกนำไปผลิตเป็นสารให้ความหวานในชื่อแอสพาร์เทมหรือนูตราสวิต

2.2.1 โปรตีนในอาหาร

แหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญคือ เนื้อสัตว์ รวมถึงทั้งสัตว์บก และสัตว์น้ำ นอกจากนี้ก็มีไข่ น้านม และจากพืช อาหารอื่นจะมีโปรตีนในสัดส่วนที่น้อยมีกรดอะมิโนชนิดที่จำเป็นต่อร่างกายหน้าที่ของโปรตีนในอาหาร โปรตีนมีคุณสมบัติต่างๆ เช่น การละลาย การดูดซับ การเกิดเจล การให้ความยืดหยุ่น และการเกิดโฟม เป็นต้น จึงนำสมบัติต่างๆ เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในอาหารชนิดต่างๆ

1) ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการดูดซับน้ำ เนื่องจากโมเลกุลโปรตีนจะประกอบด้วยสารมีขั้ว จึงทำให้โปรตีนบางชนิดละลายน้ำได้ จึงมีการเตรียมเครื่องดื่มจากโปรตีนได้แก่นมถั่วเหลือง ซึ่งโปรตีนในเนื้อสัตว์ในแป้งสาลี และมีความสามารถในการดูดซับน้ำทำให้ความนุ่ม เช่น ความนุ่มของไส้กรอก และขนมเค้ก เป็นต้น

2) ความสามารถในการเกิดเจล โปรตีนจำพวกคอลลาเจนที่ได้จากหนังสัตว์ เช่น หนังหมู หนังวัว และโปรตีนอัลบูมิน และโกลบูลินในไข่ขาว และเคซีนในน้านม สามารถเกิดเจลได้จากการแปลงสภาพจากธรรมชาติ โดยเมื่อโมเลกุลมีการคลายตัวออกจึงสามารถเกิดการ cross-link ของโมเลกุลเป็นโครงข่าย และอุ้มน้ำไว้ข้างใน จึงได้มีการนำมาใช้ในการผลิตอาหารต่างๆได้หลายประเภท เช่น คอลลาเจนใช้ในการประสานในผลิตภัณฑ์เนื้อ น้านมใช้ทำ โยเกิร์ต และเนยแข็ง ไข่ใช้ทำคัสตาร์ด เป็นต้น

3) ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน เจลาติน และโปรตีนจากไข่ขาว ช่วยให้เกิดอิมัลชันได้ดีเนื่องจากไม่มีประจุจึงทำให้เป็นตัวเชื่อมระหว่างชั้นของไขมัน และน้ำได้ดังนั้นจึงนิยมใช้เจลาตินในไอศกรีม

4) ความสามารถในการเกิดโฟม การเกิดโฟมเป็นความสามารถของโปรตีนในการเกิดเป็นฟิล์มที่บรรจุอากาศไว้ข้างใน การเกิดโฟมจะเกิดขึ้นได้ดีที่ค่าพีไอของโปรตีนเนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนไม่มีประจุ จึงไม่เกิดการผลักกัน โมเลกุลโปรตีนจึงรวมตัวกันได้ดีเกิดเป็นฟิล์มที่เหนียวคงตัวดักจับอากาศไว้ได้ดี นอกจากนี้การจะให้โฟมมีเสถียรภาพต้องมีความเข้มข้นของโปรตีนเพียงพอ การเกิดโฟมของโปรตีนในไข่ขาวถูกนำมาใช้ในการขึ้นฟูของขนมเค้ก ขนมปัง และขนมสาลี เป็นต้น

5) การเกิดความเหนียว และการเกิดความยืดหยุ่น โปรตีนในข้าวสาลีคือไกลอะดิน และกลูเตลิน เมื่อผสมเข้ากับน้ำแล้วจะช่วยให้โมเลกุลโปรตีนบางส่วนคลายตัวออกเนื่องจากแรงกล และจากการนวดทำให้สามารถทำให้โปรตีนเหล่านี้จับตัวกันเป็นร่างแหที่มีความยืดหยุ่นโดยมีพันธะไฮโดรโปกจึงทำให้มีความยืดหยุ่นดกจับแก๊สไว้ได้จึงทำให้เกิดการขึ้นฟูของขนมปัง หรือขนมเค้ก

6) นอกจากนี้โปรตีนยังให้สี กลิ่นรส และเนื้อสัมผัสแก่อาหาร เช่น สี และกลิ่นรส ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของขนมอบ ไตเพปไทด์ของกรดแอสพาร์ติก และพินิลอะลานีนที่อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ ให้รสหวานจึงใช้เป็นสารทดแทนน้ำตาลและกรดกลูตามิกที่อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมให้รสคล้ายเนื้อให้ความอร่อยกลมกล่อมแก่อาหาร จึงใช้เป็นสารปรุงรสอาหาร

2.2.2. โปรตีนเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ (Meat) หมายถึงชิ้นส่วนของร่างกายสัตว์ เช่น โค กระบือ สุกร แพะ แกะ ไก่ เป็ด กระจับปี่ เป็นต้น ที่มีมนุษย์สามารถนำมาบริโภคได้ ประกอบด้วยส่วนของเนื้อเยื่อ อวัยวะภายใน แต่ส่วนที่มีความสำคัญคือ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหรือกล้ามเนื้อ (Muscle) ซึ่งใช้เรียกในขณะที่สัตว์ยังมี ชีวิตอยู่ ส่วนคำว่าเนื้อสัตว์ จะใช้เรียกส่วนของกล้ามเนื้อหลังจากสัตว์ตายแล้ว เนื้อสัตว์ จัดเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญ มีกรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acid) เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย นอกจากโปรตีนแล้วเนื้อสัตว์ยังมีสารอาหารจำพวก ไขมัน เกลือแร่ และวิตามิน โดยเฉพาะธาตุเหล็ก ซีลีเนียม วิตามินเอ วิตามินบี 12 และกรดโฟลิก ที่ไม่สามารถพบได้ในอาหารจำพวกพืช หรือมีอยู่แต่ร่างกายจะนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย (Poor bioavailability) [20]

ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเนื้อสัตว์ รวมทั้งการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ จะช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตร และเป็นการเพิ่มช่องทางการได้รับสารอาหารโปรตีนที่หลากหลายที่ได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ให้กับผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น โดยโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะส่วนกล้ามเนื้อโครงร่างซึ่งมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 20 จะสามารถแบ่งโปรตีนในเนื้อสัตว์ตาม แหล่งที่มา และความสามารถในการละลายได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ [21]

1) ไมโอไฟบริลลาโปรตีน (Myofibrillar protein) เป็นโปรตีนที่สามารถพบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 50-55 ของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อสัตว์โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่ในการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ และสามารถละลายในเกลือ โปรตีนที่พบมากที่สุดในกลุ่มนี้คือ โทรโปไมโอซิน ไมโอซิน โทรโปนิน และแอคติน

2) ซาร์โคพลาสซึมโปรตีน (Sarcoplasmic protein) พบประมาณร้อยละ 30-34 ของโปรตีนทั้งหมด เป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มรอบเส้นใยย่อยซึ่งละลายอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึม เรียกว่า ซาร์โคพลาสซึม ซึ่งโปรตีนที่มีคุณสมบัติที่ละลายได้ในน้ำ และสารละลายน้ำเกลืออ่อนๆ โปรตีนในกลุ่มนี้จะประกอบไปด้วยไมโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน ไซโตโครม และเอนไซม์ต่างๆ

3) สโตรมอลโปรตีน (Stromal protein) พบประมาณร้อยละ 10-15 ของโปรตีนทั้งหมดเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เชื่อม และยึดให้ส่วนต่างๆ ในร่างกายสัตว์ติดกัน พบกระจายอยู่ทั่วไปในตัวสัตว์ ในโครงกระดูกจะเชื่อมยึดกล้ามเนื้อให้ติดกับกระดูกเป็นส่วนประกอบสำคัญ ในหลอดเลือดต่างๆ ห่อหุ้มเส้นใยประสาทในบางส่วน และโดยเฉพาะในกล้ามเนื้อ จะห่อหุ้มตั้งแต่ กล้ามเนื้อทั้งก้อน เรียกว่า อีพิมิเซียม (Epimysium) ส่วนที่ห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อจะเรียกว่า เพอริมิเซียม (Perimysium)

และส่วนที่ห่อหุ้มหน่วยที่เล็กสุดของกล้ามเนื้อคือเส้นใยกล้ามเนื้อ (Muscle fiber) เรียกว่าเอนโดไมเซียม (Endomysium)

2.2.3 โพรตีนจากพืช

โพรตีนจากพืชมักได้จากเมล็ดพืชน้ำมัน เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ทานตะวัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพืชที่สามารถผลิตได้ในประเทศ ยกเว้นถั่วเหลืองที่ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เพราะความต้องการใช้ภายในประเทศมีมาก ซึ่งโพรตีนจากพืชโดยเฉพาะในพืชตระกูลถั่วประกอบไปด้วยสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ สารจำพวกฟลาโวนอยด์หลายกลุ่ม เช่น สารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids) ที่ให้ผลในการป้องกันมะเร็ง สารในกลุ่มฮอร์โมนพืช (Phytoestrogen) ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ สารเหล่านี้เป็นสารเสริมสุขภาพที่พบได้เฉพาะในพืช ในขณะที่โพรตีนจากเนื้อสัตว์หลายชนิดหรือโพรตีนจากนมมักก่อให้เกิดอาการแพ้หรือรบกวนภูมิคุ้มกันของโรคบางอย่างได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้โพรตีนจากพืชเพื่อเพิ่มบทบาทเชิงหน้าที่ของโพรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในอาหาร เช่น สมบัติการดูดซึมน้ำ การเกิดฟอง โดยเฉพาะสมบัติการเกิดอิมัลชัน และการเกิดเจล ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิต และแปรรูปอาหาร [22], [23] อย่างไรก็ตามสามารถพบสารต้านโภชนาการในโพรตีนจากพืช เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่ช่วยย่อยโพรตีนในระบบทางเดินอาหารไฟเตท (Phytate) ที่ขัดขวางการดูดซึมแร่ธาตุหลายชนิดในระบบทางเดินอาหาร แแทนนิน และฮีมาแมกกลูตินิน (Hemmagglutinin) ซึ่งมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นต้น

2.2.4 การสกัดโพรตีนจากพืช

ธัญนันท์ และคณะ (2555) ศึกษาการผลิตโพรตีนไฮโดรไลเซตจากใบกระถิน โดยนำใบกระถินสดแห้ง 4 กรัม แช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ pH 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 (%v/v) 1 มิลลิลิตร คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วนเอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00075, 0.00125, 0.00175 และ 0.00225 (%v/w) ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90, 120, 150 และ 180 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นระยะ เมื่อครบกำหนดเวลาให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโพรตีน ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v) ในสัดส่วนเอนไซม์ต่อใบกระถินแห้งเป็น 0.00175 (%v/w) ที่เวลา 90 นาที มีปริมาณโพรตีนสูงสุด เท่ากับ 249.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [24]

Thongsook (2559) สกัดโพรตีน และน้ำตาลร่าข้าวสาคัดน้ำมัน โดยการใช้เอนไซม์ viscozyme ในสกัดโพรตีนด้วยเอนไซม์ และการสกัดโพรตีนด้วยสารละลายเบส คือการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณโพรตีนของร่าข้าวสาคัดน้ำมันที่สกัดด้วยสารละลายเบสและเอนไซม์ มีปริมาณเท่ากับ 14.48 ± 1.86 และ 21.51 ± 1.55 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารตั้งต้นตามลำดับ นอกจากนี้โพรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายเบส มีปริมาณฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เท่ากับ 2.47 ± 0.24 , 6.11 ± 0.31 และ 8.97 ± 0.7 มิลลิกรัม/กรัม สารตั้งต้น ตามลำดับ และโพรตีนที่ได้

จากการสกัดด้วยเอนไซม์มีปริมาณ ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส มีโปรตีนเท่ากับ 15.36 ± 3.17 , 63.45 ± 3.83 และ 2.49 ± 0.56 มิลลิกรัม/กรัม สารตั้งต้น ตามลำดับ [25]

Onasanya et al. (2015) การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจากใบ และเมล็ดมะรุมที่ใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ NaOH, CaCl₂, NaCl และ Na₃PO₄ ด้วยเทคนิคยูวีสเปกโตรสโกปี จากการทดลองพบว่าการใช้ CaCl₂ ในการสกัดโปรตีนจากใบมะรุมให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด เท่ากับ 123.0 mg/ml แต่การใช้ Na₃PO₄ ในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดมะรุมให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุดเท่ากับ 111.0 mg/ml [26]

2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนสามารถหาได้หลายวิธี คือ วิธีแรกเป็นการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีเคห์ดาล์โดยตั้งสมมติฐานว่าโปรตีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 16 ดังนั้น เมื่อหาปริมาณไนโตรเจนได้แล้วจึงคูณด้วยค่าคงที่คือ 6.25 เพื่อการหาปริมาณโปรตีนสำหรับอาหารทั่วไป เช่น เนื้อสัตว์ และไข่ เป็นต้น แต่สำหรับโปรตีนในข้าวสาลีมีปริมาณไนโตรเจนในโปรตีนสูงกว่าในอาหารทั่วไป ค่าคงที่ที่ใช้คูณกับปริมาณไนโตรเจนเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนจึงเป็น 5.70 แต่สำหรับน้ำนมจะมีค่าคงที่เป็น 6.38 ทั้งนี้ปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนจะรวมอยู่ในนี้ด้วย โดยถือว่ามัน้อยมาก วิธีการหาปริมาณไนโตรเจนจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ การย่อยสลายตัวอย่างโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นภายใต้ความร้อนสูง โดยมีโลหะหนัก เช่น ทองแดง ซิลิเนียม หรือปรอท ในรูปคอปเปอร์ซัลเฟต ซิลิเนียม ออกไซด์ หรือปรอทออกไซด์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหลังการย่อยสลายไนโตรเจนที่จะอยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นจะเป็นขั้นตอนที่สองจะเป็นการกลั่นของเหลวที่ได้จากการย่อยภายใต้สภาวะต่างโดยใช้ต่างแก่ จะได้แก๊สแอมโมเนียซึ่งจะถูกดักจับไว้แล้วนำมาไตเตรทในขั้นตอนที่สามเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน [27]

วิธีที่สองเป็นการวัดการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนกับไอออนของคิวปริก มีสีที่เกิดขึ้นจากสารเคมีที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนมีหลายชนิด แต่ละชนิดให้ความละเอียดในการตรวจวัดแตกต่างกัน และมีข้อดีของแต่ละวิธีคือ หากใช้สารละลายไบยูเรต (biuret reagent) จะวิเคราะห์สารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นในช่วง 5 ถึง 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตัวอย่าง สารละลายไบยูเรตคือสารละลายของคิวปริกซัลเฟตในโซเดียมโพแทสเซียม ทาร์เทรต โปรตีนหรือเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนตั้งแต่ 3 โมเลกุลขึ้นไป จึงจะเกิดปฏิกิริยาให้สารเชิงซ้อนซึ่งสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีสีฟ้าจนถึง สีม่วง จึงวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว หากใช้กรด bicinchoninic (BCA) ทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะได้ปฏิกิริยาสารเชิงซ้อนที่มีสีม่วง และวัดการดูดกลืนแสงของสารดังกล่าวที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรเทียบกับสารมาตรฐาน

กรณีใช้ Bradford's reagent จะเป็นการทำปฏิกิริยาของโปรตีนกับ coomassiedye-based ให้สารเชิงซ้อนซึ่งมีสีน้ำเงิน วัดค่าความดูดกลืนแสงของสารดังกล่าวที่ความยาวช่วงคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน

วิธีที่สามเป็นการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่ความยาวคลื่นของแสงที่ 205 นาโนเมตร หรือที่ 280 นาโนเมตร สำหรับการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร

เป็นผลจากการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนชนิด อะโรมาติก เช่น ทริปโตเฟน, ไทโรซีน และการดูดกลืนแสงของซิสเตอีน และของพันธะไดซัลไฟด์ของซิสเตอีน ส่วนการวัดการดูดกลืนแสงที่ 205 นาโนเมตร จะวัดได้ละเอียดขึ้นเพราะตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำก็ตรวจวัดได้ แต่ก็มี ข้อเสียคือ ถูกรบกวนจากสารอื่นได้ง่าย วิธีนี้สามารถวัดปริมาณโปรตีนที่มีความเข้มข้น 20 ถึง 3,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตัวอย่าง

2.3 โปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซท คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของโปรตีนโดยการตัดสายพอลิเปปไทด์เป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือเปปไทด์สายสั้นๆ โดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการ และปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น [28] จากรายงานการศึกษาจะพบได้ว่าเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ขึ้นอยู่กับขนาด และการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเปปไทด์ [29] ซึ่งการใช้เอนไซม์ที่ตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายโปรตีนเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตเปปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้น ได้ระดับการย่อยสูง และมวลโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้มีขนาดตามที่ต้องการ [30] เอนไซม์โปรตีนเอสที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีนมักมาจากเครื่องในของสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้าที่นำมาใช้เพื่อผลิตเปปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน คือ alcalase, flavourzyme, neutrase, pepsin, trypsin, chymotrypsin, pancreatin, papain, และ bromelain [31]

2.3.1 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่

1) การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารเคมี เป็นการทำให้พันธะเปปไทด์ของโปรตีนแตกออกโดยใช้สารละลายกรดหรือเบส ซึ่งเป็นวิธีที่มีต้นทุนการผลิตต่ำแต่ควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีนได้ยากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายกรดเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำสามารถย่อยสลายโปรตีนได้รวดเร็ว และให้กลิ่นรสที่ดี แต่จะทำให้ ทริปโตเฟน (Tryptophan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น ถูกทำลายไปสารละลายที่นิยมในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดทั้งสองชนิดนี้มีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) ซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย โดยในการย่อยสลายโปรตีนด้วย กรดซัลฟูริกนั้นจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟต และการย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกนั้นจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยสลายโปรตีน เนื่องจากเกลือที่เกิดขึ้นในกระบวนการนั้นเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไปจึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อผลิตภัณฑ์มากนัก นอกจากนี้การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูงร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงก่อให้เกิดสาร 3- monochloro-propanediols (3-MCPD) ซึ่งเป็นสารพิษที่เป็นสารก่อมะเร็ง [32]

การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายต่าง สารละลายต่างที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งหากย่อยสลายในภาวะที่รุนแรงอาจทำให้เกิดปฏิกิริยา

Racemization ของกรดอะมิโน โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก *L*-form ไปเป็น *D*-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี นอกจากนี้ ยังจะทำให้เกิดปฏิกิริยา β - elimination ของ serine และ cysteine ทำให้เกิดสารประกอบ dehydroalanine ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ และเกิดเป็นสารประกอบต่างๆ หลายชนิด เช่น lysinoalanine, ornithinoalanine และ lanthionine เป็นต้น ทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญ และสารประกอบที่เกิดขึ้นบางชนิดยังก่อให้เกิดสารพิษในอาหารอีกด้วย [33]

2) การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระได้ และเปปไทด์ที่สั้นลง การย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสูง จึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมากจนเกินไป และสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้ การใช้เอนไซม์มีอัตราการย่อยสลายโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือด่าง แต่การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic group) ในโมเลกุลของโปรตีน เช่น isoleucine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine และ valine แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีนแล้วสารประกอบที่ให้รสขมนี้จะเกิดน้อยลงเพราะสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจะจัดเรียงตัวในลักษณะที่ไม่ก่อให้เกิดรสขม จึงสามารถควบคุมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้ด้วยการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis) [33]

2.3.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน

เอนไซม์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรมซึ่งนิยมใช้เอนไซม์ในการตัดแปรโปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง และไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดแปรโปรตีนมีหลายประเภท ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละชนิด [34] โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยจะตัดพันธะเปปไทด์ของพอลิเพปไทด์ได้เป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติ และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้า เช่น

1) Alcalase เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ทำหน้าที่เป็นเอนโดเปปติเดสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 8-8.5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนที่สูงสุด [35] และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเนสอื่นๆยังพบว่า Alcalase ให้ผลผลิตของเปปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันและเปปไทด์สายสั้นที่ได้มีความต้านทานการย่อยในระบบทางเดินอาหารได้สูง [36], [37] alcalase เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายของโปรตีน (Endoproteinase) ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดสั้นและขนาดกลาง [38] alcalase มีความจำเพาะที่กว้าง โดยมีความจำเพาะสูงต่อกรดอะมิโนที่เป็นวง

(Phe, Try, Tyr) กรดอะมิโนที่เป็นกรด (Glu) กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (Met) กรดอะมิโนที่เป็นโซ่ตรง (Leu, Ala) กรดอะมิโนที่มีหมู่ -OH (Ser) และกรดอะมิโนที่เป็นเบส (Lys) [39] เพปไทด์ที่ได้จากการย่อยปลา silver carp ด้วยเอนไซม์ alcalase แสดงกิจกรรมในการจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ flavourzyme [40]

2) Flavourzyme เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* ทำหน้าที่เป็นทั้งเอนโดเปปติเดส และเอกโซเปปติเดส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-7 เป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดพันธะเพปไทด์ภายในโครงสร้างโปรตีน และตัดจากปลายสายโปรตีน มีความจำเพาะที่กว้าง ผลผลิตที่ได้จะเป็นเพปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนอิสระ [41] มีการศึกษานำเอนไซม์ Flavourzyme มาใช้ผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันจากโปรตีนปลา เช่น ปลาทุบแกก ปลานิล เป็นต้น

3) Neutrase ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ทำหน้าที่เป็นเอนโดเปปติเดส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะอยู่ในโครงสร้าง (Metallo endoproteinase) มีหมู่อะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic amino acids) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถตัดพันธะเพปไทด์บนสายโปรตีนหลายตำแหน่ง [42] และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันด้วยโปรตีนจากข้าวในส่วนที่เป็นเอนโดสเปิร์ม [43]

2.3.3 ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

ระดับการย่อยสลายโปรตีนเป็นดัชนีที่ใช้อธิบายปริมาณการทำลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามค่า DH สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับ ความสะดวก ความเหมาะสม และระดับความละเอียดและเที่ยงตรงที่ต้องการ [28] การวิเคราะห์ และคำนวณระดับการย่อยโปรตีนสามารถทำได้ 3 วิธี คือการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน การวิเคราะห์ free α -amino groups และการไตเตรทโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา [44]

1) การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เหลืออยู่หลังจากการตกตะกอนโปรตีน ไฮโดรไลเซทด้วย trichloroacetic acid (TCA) สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีของ Kjeldhal การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV ของเปปไทด์ที่มีหมู่ aromatic และการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400-700 นาโนเมตรหลังจากผ่านปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี เช่น ปฏิกิริยา Biuret

2) การวิเคราะห์ Free α - amino group โดยทั่วไปจะนิยมใช้วิธี formal titration จากการวิเคราะห์สามารถประมาณค่าระดับการย่อยสลายโปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้ การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนได้เช่นกัน โดยวิธีเก่าแก่ที่สุดคือการใช้ ninhydrine เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะได้สารประกอบสีน้ำเงินเข้ม วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูงแต่มีข้อเสียหลายอย่าง เช่น สารเคมีที่ใช้ไวต่อออกซิเจน มีการรบกวนจากแอมโมเนีย ทำให้ค่าที่ได้จาก Blank สูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน [45] ส่วน TNBS นั้นเป็นสารที่จำเพาะต่อ primary amino groups ทำการวิเคราะห์โดยผสม TNBS กับโปรตีนไฮโดรไลเซทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน สารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย picric acid ทำให้ค่าที่ได้จาก Blank สูง TNBS ไม่เกิดปฏิกิริยากับ proline และ

hydroxyproline และ TNBS จะสามารถทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม amino group ของ lysine ได้ [28] สารประกอบอีกสองชนิด คือ fluorescamin และ OPA เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนได้ด้วยวิธี fluorometry ซึ่งวิธีนี้จะให้ความไวสูงแต่มีข้อเสีย คือ อนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจะมีความเสถียรต่ำ [46]

3) การไตเตรทโปรตรอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เรียกว่า เทคนิค pH-stat ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย ซึ่งทำให้หมู่ อะมิโนหลุดออกมา และมีการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งทำให้ pH ของโปรตีนไฮโดรไลเซตลดลง ดังนั้นจึง ต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการด้วย sodium hydroxide หรือ calcium hydroxide โดยระดับการย่อยสลายโปรตีนสามารถคำนวณจากปริมาณ สารละลายเบสที่ใช้ระหว่างทำปฏิกิริยา

วิธีการนี้จะใช้ในการวัดระดับการย่อยสลายโปรตีนอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ แต่ค่าระดับการย่อยสลายโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ จะเป็นค่าสัมพัทธ์ และหากต้องการความถูกต้องแม่นยำจะต้องตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ เช่น TNBS หรือ OPA [44]

2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซต

สมบัติเชิงหน้าที่ คือ สมบัติทางเคมีหรือสมบัติทางกายภาพที่มีผลต่อพฤติกรรมของโปรตีนใน อุตสาหกรรมอาหารนำโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายมาเป็นส่วนประกอบอย่างแพร่หลายเพื่อปรับปรุง คุณภาพ และเนื้อสัมผัสของอาหารหรือเพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับอาหาร [33] เนื่องจากโปรตีน ไฮโดรไลเซตมีผลโดยตรงต่อคุณลักษณะของอาหาร ดังนั้นการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตไปประยุกต์ใช้ใน อาหารต่างๆจะต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วย โปรตีนไฮโดรไลเซตถูกนำมาใช้ เป็นส่วนผสมในอาหารสามารถทำหน้าที่สำคัญต่างๆได้หลายประการ [47]

2.4.1 สมบัติการละลาย (Solubility)

การละลายเป็นสมบัติเบื้องต้นที่สำคัญของโปรตีนไฮโดรไลเซต เพราะเป็นสมบัติที่มี อิทธิพลต่อสมบัติในด้านอื่นๆ เช่น อิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟม และการเกิดเจล เป็นต้น [48] จาก งานวิจัยของพรชนัน (2548) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ความเข้มข้น 1 กรัมเอนไซม์ต่อโปรตีนโอคารา 100 กรัม พบว่าโปรตีนโอคาราไฮโดรไลเซต มี ความสามารถในการละลายดีขึ้น แต่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า surface hydrophobicity [49] นอกจากนี้ Govindaraju et al. (2004) พบว่าโปรตีน arachin ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม โปรติเอส มีค่าการละลายสูงขึ้น โดยโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีระดับการย่อยสลายสูงมีค่าการละลายเพิ่ม ขึ้นอยู่ในช่วงร้อยละ 55-60 ส่วนที่ระดับการย่อยสลายต่ำมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วงเป็นร้อยละ 14-16 (pH 4-4.5) [50]

Klompong et al. (2007) ศึกษาความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซต จากปลาสิ่กุนข้างเหลือง (*Selavoides leptolepsis*) ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์หรือ เอนไซม์อัลคาเลส ที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 5 15 และ 25 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตมี

ความสามารถในการละลายสูงสุดเมื่อระดับการย่อยสลายโปรตีนมีค่าเท่ากับร้อยละ 25 และจากการทดสอบอิทธิพลของ pH ในช่วง 2-12 ต่อความสามารถในการละลาย พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่าการละลายต่ำสุดที่ pH เท่ากับ 4 และมีค่าการละลายสูงสุดที่ pH ในช่วง 8-11 ส่วนโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีค่าการละลายสูงสุดในช่วง pH เท่ากับ 6-8 [51] เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thiansilakul et al. (2007) ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาทุแวก (*Decapterus maruadsi*) มีค่าการละลายสูงขึ้นเมื่อโปรตีนผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยค่าการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ตรวจสอบด้วยวิธี nitrogen solubility index มีค่าสูงถึงร้อยละ 99 [52]

2.4.2 สมบัติการเกิดฟอง (Foaming properties)

สมบัติการเกิดฟองของโปรตีน หมายถึง ความสามารถของโปรตีนที่ทำให้เกิดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว และรักษาความคงตัวให้กับฟิล์มไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากแรงกระทำจากภายนอก ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการสมบัติการเกิดฟอง ได้แก่ ไอศกรีม เค้ก และเมอร์แรงจ์ เป็นต้น สมบัติการเกิดฟองจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโปรตีน surface hydrophobicity ประจุ และค่า pI ของโปรตีน เช่น globular protein จะเพิ่มความเสถียรของฟอง (Foaming stability) ในขณะที่ fibrous protein จะช่วยให้เกิด Interfacial ของโปรตีนระหว่างอากาศกับของเหลวอย่างรวดเร็วทำให้มีความสามารถในการเกิดฟอง (Foaming activity) สูง [53]

Chabanon et al. (2007) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีน rape seed พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลายโปรตีน (DH) ร้อยละ 5 มีความสามารถในการเกิดฟองสูงสุด และพบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 10 โปรตีนไฮโดรไลเซทมีความคงตัวของฟองดีที่สุด ที่เวลา 10, 30 และ 120 นาที ตามลำดับ [22]

Taha et al. (2002) ศึกษาผลของระดับการย่อยสลายต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนจากเมล็ดงา และโปรตีนจากจมูกข้าว โดยย่อยสลายโปรตีนทั้ง 3 ชนิดด้วยเอนไซม์ปาเปน และโบรมิเลน พบว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถปรับปรุงสมบัติการเกิดฟองของโปรตีนให้สูงขึ้นได้เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย โดยพบว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (0% DH) มีความสามารถในการเกิดฟองน้อยที่สุด รองลงมาคือโปรตีนจากจมูกข้าวที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปน (8.8% DH) และโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (7.3% DH) [54]

2.4.3 สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์

การเกิดอิมัลชันเป็นคุณสมบัติอันดับต้นๆที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในกระบวนการผลิตอาหาร อิมัลชันคือ ระบบของเหลวตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปที่ไม่ละลายซึ่งกัน และกันโดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวในลักษณะหยดกลมเล็กๆ ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ระบบของอิมัลชันแบ่งออกตามลักษณะการกระจายตัว เป็น 2 ประเภท คือระบบที่หยดน้ำมันกระจายอยู่ในน้ำ เรียกว่า อิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water, O/W) และระบบที่หยดน้ำกระจายในน้ำมัน เรียกว่า อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil, W/O) ในระบบอาหารโปรตีนทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ หรือสารก่ออิมัลชัน โดยมีการจัดเรียงส่วนที่เป็น hydrophobic ของโมเลกุลโปรตีนบริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน [28] ความสามารถในการเกิดอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจะขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลาย

โปรตีน ความเป็นกรดเบส เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน และ surface hydrophobicity เป็นต้น โดยความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะมีค่าต่ำ ณ จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) [33]

Chabanon et al. (2007) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนเมล็ดเรปซิด (Rapeseed) ไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ และค่าความคงตัวของการเกิดอิมัลชันดีกว่าโปรตีนเมล็ดเรปซิดที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยสลาย นอกจากนี้ได้ศึกษาโดยการแยกโปรตีน 2 ชนิดจากโปรตีนเมล็ดเรปซิด และสามารถผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท คือโปรตีนโกลบูลินไฮโดรไลเซท และโปรตีนอัลบูมินไฮโดรไลเซท พบว่าที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 5 โปรตีนโกลบูลินไฮโดรไลเซทมีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และค่าความคงตัวของอิมัลชัน สูงสุด คือมีค่าเท่ากับร้อยละ 50 ± 2 และที่ร้อยละ 45 ± 4 ตามลำดับ ส่วนโปรตีนอัลบูมินไฮโดรไลเซท มีค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 10 คือมีค่าเท่ากับร้อยละ 54 ± 1 และมีค่าความคงตัวของการเกิดอิมัลชันสูงสุดที่ระดับย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 5 คือเท่ากับร้อยละ 69 ± 9 [22]

Klompong et al. (2007) ศึกษาสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิกุนข้างเหลือง (*Selavoides leptolepsis*) ที่ผลิตด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตโดยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และมีค่าความคงตัวของอิมัลชันสูงสุดที่ระดับการย่อยสลายโปรตีนร้อยละ 5 และทำการทดสอบที่ pH เท่ากับ 10 และ 8 ตามลำดับ [51]

ธัญพร (2550) ศึกษาการผลิต และสมบัติการเกิดเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหอยเป่าฮือ (*Haliotis asinina*) พบว่าโปรตีนหอยเป่าฮือไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความคงตัวดีกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้น 0.10 M มีผลต่อการเพิ่มค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความคงตัวของอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ bovine serum albumin (BSA) สามารถพบได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงกว่า BSA แต่มีความคงตัวของอิมัลชันใกล้เคียงกัน [28]

2.5 การออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซท

ปัจจุบันมีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเมล็ดพืชมากขึ้น โดยเฉพาะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากวัสดุเศษเหลือที่ได้จากเมล็ดพืชน้ำมัน จึงทำให้มีงานวิจัยที่มุ่งศึกษาถึงผล และประโยชน์ในเชิงสุขภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทมากขึ้น [55], [22], [56] ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนไฮโดรไลเซทช่วยลดความดัน [57] ผลของโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [58], [59], [60] ผลของโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อการต้านภาวะคอเลสเตอรอลสูง และการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [61] เป็นต้น โปรตีนไฮโดรไลเซทนั้นเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่เหมาะสม

จะนำมาเป็นองค์ประกอบในอาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติในด้านการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งได้รับความสนใจเป็นพิเศษเนื่องจากสามารถนำมาทดแทนสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบสังเคราะห์ (เช่น BHA, BHT และ TBHQ) ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ได้ [29]

Pena-Ramos et al. (2003) นำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ chymotrypsin มาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถยับยั้งการฟอร์มตัวของคอนจูเกตเต็ดไดอีน (Conjugated dienes) และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้เมื่อทดสอบปริมาณการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) [62]

Zhu et al. (2006) ทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซท จากจมูกข้าวสาลีที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจมูกข้าวสาลีที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1500 Da มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Autooxidation) ของไขมันได้ใกล้เคียงกับ α -tocopherol และเมื่อใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีเทียบเท่า BHT (Butylated hydroxytoluene) ที่ความเข้มข้นเท่ากัน [55]

สุภาวดี (2550) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเซท พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt) มีฤทธิ์ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อย และความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน [23]

เยาวภา (2549) ศึกษากิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกล้ามเนื้อปลาหูฉลาม (*Decapterus maruadsi*) ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 20 40 และ 60 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีกิจกรรมการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) และ reducing power สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแต่มีประสิทธิภาพการจับกับโลหะ (Fe^{2+}) ที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับระดับการย่อยสลายเดียวกัน และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เตรียมจากเนื้อปลาหูฉลามที่ผ่านการกำจัดไขมัน และมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 60 มีประสิทธิภาพการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH และ reducing power สูงสุดขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซทที่เตรียมจากเนื้อปลาที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดไขมัน และมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนร้อยละ 20 มีประสิทธิภาพการจับกับโลหะ (Fe^{2+}) ที่ดี [63]

Chanput et al. (2009) ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนจากข้าวบาร์เลย์ และโปรตีนรำข้าวพบว่า โปรตีนข้าวบาร์เลย์ และโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับทริปซินมีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซท นอกจากนี้จากการแยกชนิดของโปรตีนรำข้าวทั้งหมด 4 ชนิด คือ albumin, globulin, prolamin และ glutelin พบว่าโปรตีนชนิด globulin มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบจำลองกรดลิโนเลอิกได้ดีที่สุด และจากการทดสอบความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก (Fe^{3+}) ของโปรตีนข้าวบาร์เลย์ และโปรตีนรำข้าว พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปปซินมีความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก (Fe^{3+}) ให้เปลี่ยนเป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย [64]

ศกุนตลา และคณะ (2552) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเครื่องในปลาหูนาพันธุ์โอแถบโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟาโวไซม์ พบว่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ flavourzyme (FL) มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันสูงกว่า alcalase (AL) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วย (FL) มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน DPPH และความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริกเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเพิ่มขึ้น แต่กิจกรรมต้านออกซิเดชัน ABTS ลดลง ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วย AL มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นสำหรับทุกวิธีที่ทดสอบเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มขึ้น [65]

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

2.6.1 ความหมาย และความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ [66]

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หมายถึงโมเลกุลของสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังสารออกซิไดส์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ทำให้เกิดกลืนรสผิดปกติในอาหาร เกิดสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และยังสามารถทำลายคุณค่าโภชนาการด้วย นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังสามารถทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันทั้งในระบบของอาหาร และร่างกายมนุษย์ ในระบบของอาหารนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหาร และลดหรือกำจัดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในชั้นทุติยภูมิ ซึ่งจะช่วยรักษาคุณภาพของอาหารด้านต่างๆ เช่น กลิ่นรส เนื้อสัมผัส คุณค่าทางโภชนาการ และสีของอาหารในระหว่างการแปรรูป และการเก็บรักษา นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน และอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างหมู่คาร์บอนิลของอนุพันธ์ลิพิดกับโปรตีน สำหรับในร่างกายมนุษย์นั้นสารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของเซลล์ต่างๆ จากการเกิดออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และหลอดเลือด โรคความจำเสื่อม หรือโรคชรา

2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระจำแนกตามกลไกการเข้าทำปฏิกิริยาในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ดังนี้

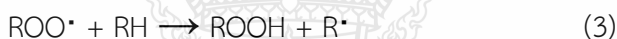
2.6.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระขั้นปฐมภูมิ (Primary antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระขั้นปฐมภูมิเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระโดยการชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในขั้นเริ่มต้น (Initiation) หรือขัดขวางการเกิดออกซิเดชันในขั้นต่อเนื่อง (Propagation) โดยในขั้นเริ่มต้นของการเกิดออกซิเดชัน ไฮโดรเจนอะตอมจะหลุดออกจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ (1)



อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเพอร์ออกซี (ROO[•]) ในขั้นต่อเนื่อง ดังสมการที่ (2)



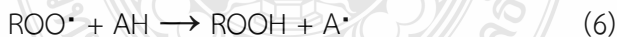
ในขั้นต่อเนื่องอนุมูลของเพอร์ออกซีทำปฏิกิริยากับกรดไขมันโมเลกุลอื่นเกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเพอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระเกิดขึ้นนั้น อนุมูลอิสระของกรดไขมันที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระ และสามารถกระตุ้นกลไกการเกิดออกซิเดชันต่อเนื่องได้อีก ดังสมการที่ (3)



สารประกอบไฮโดรเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไม่คงตัว และสามารถสลายไปเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถเหนี่ยวนำในขั้นต่อเนื่องได้อีก ดังสมการที่ (4) และ (5)



หน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระขั้นปฐมภูมิคือทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ และเปลี่ยนไปเป็นสารที่ไม่มีอนุมูล และมีความคงตัวมากกว่า โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระกลายเป็นอนุมูลอิสระเอง (A[•]) ที่มีความคงตัวมากกว่า และไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันต่อไปได้อีก ดังสมการที่ (6) – (8)



อนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะมีความเฉื่อยต่อปฏิกิริยา เนื่องจากอิเล็กตรอนที่ไม่เสถียรของสารต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการเรโซแนนซ์ (Resonance) ภายในวงแหวนฟีนอลทำให้เกิดโครงสร้างที่มีความคงตัว ส่งผลให้ปฏิกิริยาในขั้นต่อเนื่องถูกยับยั้งหรือเกิดขึ้นได้ช้าลง นอกจากนี้อนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบเพอร์ออกซี ออกซี และอนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ดังสมการที่ (9), (10) และ (11) ตามลำดับ เกิดโครงสร้างไดเมอร์ และทำให้ปฏิกิริยาสิ้นสุดลง





สารต้านอนุมูลอิสระชั้นปฐมภูมิแบบสังเคราะห์ที่นิยมใช้ ได้แก่ โพรพิลแกลเลต บีเอชเอ บีเอชที และทีบีเอชคิว อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการนำสารต้านอนุมูลอิสระชั้นปฐมภูมิจากธรรมชาติมาใช้ในอาหารมากขึ้น เช่น วิตามินอี โทโคฟีรอล และแคโรทีนอยด์ เป็นต้น

2.6.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระชั้นทุติยภูมิ (Secondary antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระชั้นทุติยภูมิเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอัตราการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันค่อนข้างช้า และกลไกในการยับยั้งหลายขั้นตอน แต่ไม่สามารถเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้กลับไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียรสูงกว่าได้ บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระชั้นทุติยภูมิมีหน้าอย่างด้วยกัน เช่น สามารถจับโลหะ ให้อิเล็กทรอนิกส์กับสารต้านอนุมูลอิสระชั้นปฐมภูมิ ทำหน้าที่เป็นสารเสริมฤทธิ์ การสลายสารประกอบไฮโดรเพอร์ออกไซด์ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร และยับยั้งซิงเกิลออกซิเจน เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดซิตริก กรดแอสคอร์บิก แอสคอร์บิลปาล์มิเตต เลซิทีน กรดทาร์ทาริก และแคโรทีนอยด์ เป็นต้น

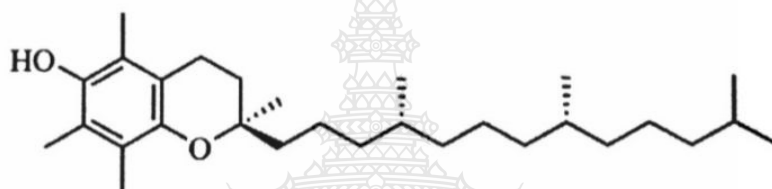
2.6.2.3 สารต้านอนุมูลอิสระจำแนกตามแหล่งที่มา สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกตามแหล่งที่มาได้ 2 ประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ โดยสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidant) หมายถึงสารสังเคราะห์ที่เติมลงไปในอาหารโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในอาหาร เช่น อาหารประเภทไขมัน และน้ำมัน ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (Natural antioxidant) หมายถึงสารที่พบในธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ มีความสามารถในการต้านหรือชะลอการเกิดออกซิเดชัน ในการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ครั้งแรกในอาหารนั้นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืช แต่ต่อมาได้มีการสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเลียนแบบโครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเนื่องจากพบว่ามีประสิทธิภาพ และสะดวกต่อการใช้งานมากกว่า จึงทำให้มีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์กันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสนใจการใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมากขึ้นเนื่องจากมีความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยของการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ต่อสุขภาพ

2.6.3 ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

2.6.3.1 วิตามิน ในผัก และผลไม้ที่นิยมรับประทานในชีวิตประจำวัน วิตามินตัวหนึ่งที่มักพบเป็นองค์ประกอบอยู่เสมอคือวิตามินซี หรือ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ซึ่งเป็นสารประกอบแลคโตนที่มีคาร์บอน 6 อะตอม สังเคราะห์มาจากสารตั้งต้นคือ GDP-mannose จากโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิลด้วยกัน 4 หมู่ จึงทำให้วิตามินซีมีความสามารถในการละลายในน้ำได้ดี และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส่วนที่เป็นของเหลวระหว่างเซลล์ (Intercellular fluid) และภายในเซลล์ (Cytosol) ได้ นอกจากนี้วิตามินซีมีคุณสมบัติทางชีวภาพด้านอื่น เช่น ช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจน หรือการทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ Cu^+ -dependent monooxygenase และ Fe^{2+} -dependent dioxygenase โดยเป็นตัวให้อิเล็กตรอนขณะที่เอนไซม์เกิดการดำเนินงาน (One-electron reaction) เป็นต้น วิตามินซีอยู่ในรูปของกรดแอสคอร์บิกหรือแอสคอร์เบตภายหลังการทำ

หน้าที่รีดิวซ์สารออกซิแดนซ์แล้ว แอสคอร์เบตจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และภาวะรีด็อกซ์ โดยในปฏิกิริยารีดักชันขั้นแรก แอสคอร์เบตซึ่งเป็น reduced form จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซมิดีไฮโดรแอสคอร์เบต (Semidehydroascorbate; SDA) หรืออนุมูลอิสระ ascorbyl radical [67]

2.6.3.2 วิตามินอี วิตามินอีเป็นชื่อเรียกกลุ่มสารโทโคเฟอรอล (Tocopherol) และโทโคไตรอีนอล (Tocotrienol) พืชสังเคราะห์วิตามินอีมาจาก homogentistic acid วิตามินอีมีคุณสมบัติละลายในไขมัน และในธรรมชาติพบว่า มีโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลที่มีโครงสร้างแตกต่างกันถึง 8 ชนิด ได้แก่ α -, β -, γ - Δ -tocopherol และ α -, β -, γ - Δ -tocotrienol อย่างไรก็ตามพบวิตามินอีที่อยู่ในรูป α -tocopherol ดังแสดงในภาพที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ และป้องกันการออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low-density lipoprotein (LDL) oxidation) [67]



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ α -tocopherol
ที่มา: ไมตรี (2555) [67]

2.6.3.3 สารพอลิฟีนอล (Polyphenol) [66] สารพอลิฟีนอลที่พบในพืชมีมากกว่า 8,000 ชนิด โดยกลุ่มของสารพอลิฟีนอลนั้นเป็นสารที่มีหมู่ฟีนอล ซึ่งเป็นวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) มาเกาะอยู่ภายในโมเลกุล เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในชั้นทุติยภูมิของพืช ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มที่มีหมู่ฟีนอลเพียงหมู่เดียว อยู่ในรูปไกลโคไซด์ (Glycoside) ประกอบด้วยฟลาโวน (Flavone) ฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาวาโนน (Flavanone) ฟลาวาโนนอล (Flavanonol) และแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ส่วนไอโซฟลาโวน (Isoflavone) เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปอะไกลโคน (Aglycone) ประกอบด้วยเจนีสทีน (Genistein) ไกลซิทีน (Glycitein) และไดเซอีน (Daizein)

สารในกลุ่มนี้สามารถจับกับไอออนของโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ไอออนของโลหะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปได้

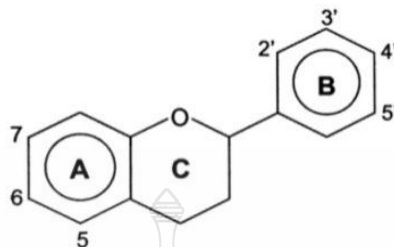
1) การวิเคราะห์สารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี total phenols assay by Follin-Ciocalteu reagent (FCR) [67] เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารใดๆ โดยการวัดปริมาณที่มีอยู่ของสารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds) ภายใต้หลักการที่เชื่อว่าสารกลุ่มฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง ดังนั้นสารทดสอบใดๆ ที่มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกมากก็จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากเช่นกัน ในกรณีการใช้ FCR สำหรับการวัดปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกมักพบความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดีมาก

กับวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแบบการถ่ายเทอิเล็กตรอน (ET-based assay) ทั้งนี้เนื่องจากกลไกของ FCR ในการทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มฟีนอลิกเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนสีสารละลายจากสีเหลืองเข้มเป็นสีเขียวน้ำเงินนั้น สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี spectrophotometry ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 750 และ 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน แสดงผลเป็นปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่าง เทียบเท่ากับกรดแกลลิก การทดสอบนี้มีความน่าเชื่อถือ เทียบเคียงกับผลที่ได้ด้วยวิธี HPLC มีค่าใช้จ่ายน้อย เนื่องจากสารเคมีมีราคาไม่สูงนักและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าวิธี HPLC คุณสมบัติของ FCR ที่สามารถจะเกิดปฏิกิริยากับสารกลุ่มฟีนอลิกได้ เชื่อว่าจะต้องเกิดจากการมี heteropoly phosphotungstates-molybdates เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่มีการถ่ายเทของอิเล็กตรอนจำนวนหนึ่งหรือสองตัวจะทำให้เกิดสีน้ำเงินจากกลุ่ม (PMoW₁₁O₄₀)⁴⁻ ซึ่งจากหลักฐานเป็นที่ปรากฏว่าธาตุโมลิบดีนัม (Molybdenum; Mo) สามารถถูกรีดิวซ์ (รับอิเล็กตรอน) ได้อย่างง่ายดาย และส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างสารรีดักแทนซ์ ข้อจำกัดการทำปฏิกิริยาของ FCR คือ FCR มีความจำเพาะต่ำคือ สามารถถูกรีดิวซ์ได้โดยสารกลุ่มอื่นนอกเหนือจากฟีนอลิกได้ เช่น การถูกรีดิวซ์โดยวิตามินซี และ Cu(I) เป็นต้น รวมทั้งการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่มฟีนอลเองกับ FCR เช่น หมู่ฟีนอลิกในกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyrosine) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ FCR แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแต่อย่างใด นอกจากนี้สารกลุ่มฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยากับ FCR ได้ดีในสภาพที่เป็นเบสเท่านั้น (ค่า pH ประมาณ 10) ในสภาพที่เป็นเบสนี้จะเกิดการแตกตัวของ phenolic proton จากกลุ่มฟีนอลได้เป็น phenolate anion ที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ FCR และเปลี่ยนสี FCR เป็นสีน้ำเงิน ปฏิกิริยาดังกล่าวจึงจัดอยู่ในประเภทปฏิกิริยาแบบถ่ายเทอิเล็กตรอน และตัวอย่างที่จะสามารถทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี FCR ได้ต้องเป็นตัวอย่างที่ละลายได้ดีในน้ำเท่านั้น

2) ฟลาโวนอยด์ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นที่รู้จักกันมานานร่วมศตวรรษในรูปของสารมีสีที่อยู่พืช หลังการค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพโดย Rusznyak และ Szent-Gyorgyi ในปี ค.ศ. 1936 สารในกลุ่มนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มวิตามินโดยมีชื่อเรียกคือ “vitamin P” ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงการจัดกลุ่มใหม่ ในเวลาต่อมาฟลาโวนอยด์จัดอยู่ในกลุ่มของ polyphenol compounds ที่พบได้ทั่วไปในพืชมากมายหลายชนิด ถูกสร้างขึ้นอันเนื่องมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ secondary metabolites มักพบอยู่ในรูปโครงสร้างที่มีน้ำตาลเกาะเรียกว่า glycosides จึงทำให้สารกลุ่มนี้ละลายน้ำได้ดี สารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบได้ทั่วไปในอาหาร และเครื่องดื่มที่มาจากพืชในธรรมชาติ เช่น ผลไม้ ผัก ชา กาแฟ โกโก้ และไวน์ โครงสร้างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปัจจุบันนี้มีโครงสร้างของสารแบบพอลิฟีนอลที่รู้จักกันกว่า 8,000 ชนิด ในบรรดาสารทั้งหมดของฟลาโวนอยด์นั้น จัดเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดในสารโพลีฟีนอลทั้งหมด มีโครงสร้างทั่วไปเป็น diphenylpropanes (C₆-C₃-C₆) ประกอบด้วยโครงสร้างวงแหวน (Aromatic rings) ที่มีธาตุคาร์บอนจำนวน 15 ตัว เรียงตัวกันในรูปวงแหวนเบนซินจำนวน 2 วง เชื่อมต่อกันด้วยธาตุคาร์บอน 3 อะตอม ดังแสดงในภาพที่ 2.2

- โครงสร้างวงแหวน A มาจากโมเลกุลของ resorcinol หรือ phloroglucinol ที่ถูกสร้างโดย acetate pathway และมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxylation) ที่ตำแหน่งที่ 5 และ 7

- โครงสร้างวงแหวน B ถูกสร้างโดย Shikimate pathway และมีคาร์บอนเพิ่มเติมไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 4', 3'4' หรือ 3'4'5'

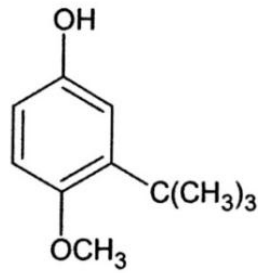


ภาพที่ 2.2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์
ที่มา: โมตรี (2555) [67]

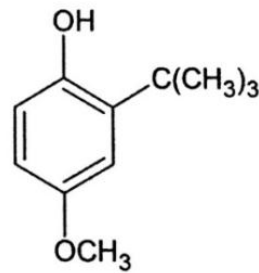
สารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ตามความแตกต่างกันของโครงสร้างวงแหวน C (Heterocycling C-ring) ได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ flavones, flavonols, flavanones, catechins, anthocyanidines และ isoflavones

ทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์ในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้าง และองค์ประกอบ โดยเมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และการออกฤทธิ์แล้วพบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับความง่ายของการปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom donation) จากกลุ่มไฮดรอกซิลที่อยู่บนโครงสร้างวงแหวน (Aromatic hydroxyl group) ให้แก่อนุมูลอิสระ และความสามารถของสารโครงสร้างวงแหวนในการให้อิเล็กตรอนไร้คู่ (Unpaired electron) เป็นผลเนื่องจากการเกิดการเวียนของอิเล็กตรอน (Electron delocalization)

2.6.3.4 บิวทิลเลท ไฮดรอกซิลอะนิโซล (Butylated hydroxyanisole; BHA) BHA (2-tert-butyl-4-hydroxyanisole และ 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole) พบว่าจะ มีโครงสร้างเคมีดังแสดงในภาพที่ 2.3 เป็นของแข็งสีขาว คล้ายขี้ผึ้ง สามารถละลายได้ในไขมัน อัตราส่วนที่นิยมใช้โดยทั่วไป ได้แก่ ส่วนผสมของ 3-BHA และ 2-BHA ในอัตราส่วน 9:1 โดย 3-BHA มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า 2-BHA มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเหมือน BHT โดย conjugated aromatic ring ของ BHA ทำให้อนุมูลอิสระคงตัว และถูกแยกออกจากกัน และสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระได้ด้วย จึงนิยมใช้ในเครื่องสำอางเพื่อเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเช่นเดียวกับการใช้ BHT นอกจากนี้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ขนมอบ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม ผลิตภัณฑ์ลูกอม และบรรจุภัณฑ์ต่างๆ และปิเอชเอยังสามารถควบคุมกิจกรรมของจุลินทรีย์ และใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ปิเอชที [67], [66]



3-Tertiary-4-hydroxyanisole



2-Tertiary-4-hydroxyanisole

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างเคมีของ BHA (3-tert-butyl-4-hydroxyanisole และ 2-tert-butyl-4-hydroxyanisole)

ที่มา: โมตรี (2555) [67]

Siddhuraju et al. (2003) วิจัยเกี่ยวกับความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบมะรุม ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และกรดแอสคอร์บิก ที่ได้จากต้นมะรุมในสถานที่ที่มีภูมิอากาศต่างกัน 3 แห่ง ได้แก่ ประเทศอินเดีย นิคารา กัว และไนเจอร์ โดยการใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น 80% เมทานอล และ 70% เอทานอล จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี folin-ciocalteu assay ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้ rutin เป็นสารมาตรฐาน และสามารถตรวจสอบปริมาณกรดแอสคอร์บิกด้วยวิธี 2,6-dichlorophenolindophenol dye method นอกจากนี้ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity) โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity จากการวิจัยพบว่าใบมะรุมที่ได้จากประเทศนิคารากัว ซึ่งถูกสกัดด้วย 80% เมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (12.33 ± 0.46 มิลลิกรัม gallic acid eq./1 กรัม สารตั้งต้น) และปริมาณฟลาโวนอยด์ (14.07 ± 0.83 มิลลิกรัม rutin eq./1 กรัม สารตั้งต้น) มากที่สุด และปริมาณกรดแอสคอร์บิกมากที่สุด เท่ากับ 0.055 ± 0.01 มิลลิกรัม/1 กรัม สารตั้งต้น ได้จากการสกัดใบมะรุมของประเทศนิคารากัว ซึ่งถูกสกัดด้วยน้ำกลั่น อย่างไรก็ตาม ปรากฏว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของใบมะรุมจากประเทศอินเดีย ซึ่งถูกสกัดด้วย 70% เอทานอล มีค่ามากที่สุด เท่ากับ 66.8% [68]

Naeem et al. (2012) ศึกษาเกี่ยวกับการหาสภาวะเหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก จากใบมะรุมด้วย 50, 75 และ 100% เมทานอล ที่อุณหภูมิ 30, 60 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที จากนั้นวิธีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี folin-ciocalteu assay จากการทดลองพบว่าการใช้ตัวทำละลาย 50% เมทานอล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 13.14 mg/g สารตั้งต้น[69]

Vongsak et al. (2013) วิจัยเกี่ยวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ของใบมะรุมสด และแห้ง ด้วยวิธีการสกัดต่างๆ ได้แก่ การใช้แรงดัน (Squeezing) การต้ม (Decoction) การหมักหรือการสกัดเย็น (Maceration) การแช่หรือการไหลซึม (Percolation) และการสกัดแบบต่อเนื่องหรือการสกัดร้อนด้วยเครื่องสกัดแบบซอกเลต (Soxhlet extraction) โดยใช้ตัวทำ

ละลาย ได้แก่ น้ำกลั่นสำหรับใช้ในวิธีการใช้แรงดัน (Squeezing) และการต้ม (Decoction) ในขณะที่ใช้ตัวทำละลาย 50% และ 70% เอทานอล ใช้ในวิธีการหมักหรือการสกัดเย็น (Maceration) การแช่หรือการไหลซึม (Percolation) และการสกัดแบบต่อเนื่องหรือการสกัดร้อนด้วยเครื่องสกัดแบบซอกเลต (Soxlet extraction) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ด้วยการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง (High pressure liquid chromatography: HPLC) หลังจากนั้นได้นำมาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity) โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay) จากการวิจัยพบว่า การสกัดด้วยวิธีการหมักหรือการสกัดเย็น (Maceration) โดยใช้ 70% เอทานอล สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์จากใบมะรุมแห้งได้มากที่สุด เท่ากับ 13.23 g/100 g สารตั้งต้น และ 6.2 g/100 g สารตั้งต้น ตามลำดับ นอกจากนี้จากการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่สกัดจากวิธีดังกล่าว ด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity พบว่ามีค่าการยับยั้งสูง เท่ากับ 62.94 $\mu\text{g/ml}$ และวิธีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay) ได้สูงสุดเท่ากับ 51.50 mmol FeSO_4 สมมูล/100 g สารตั้งต้น [70]

Premi et al. (2013) สกัดน้ำมันจากเมล็ดมะรุมด้วยการสกัดแบบต่อเนื่องหรือการสกัดร้อนด้วยเครื่องสกัดแบบซอกเลต (Soxlet extraction) โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมัน รวมทั้งศึกษาจลศาสตร์ในการสกัด โดยแบ่งสภาวะในการสกัด ได้แก่ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อวัตถุดิบ (5:1, 7:1 และ 9:1) อุณหภูมิ (50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส) และเวลาในการสกัด (2, 4 และ 6 ชั่วโมง) จากการทดลองพบว่าที่สภาวะที่ได้ปริมาณน้ำมันจากมะรุมมากที่สุด (33.30%) คือ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อวัตถุดิบ เท่ากับ 9:1 ที่อุณหภูมิ 67.84 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.6 ชั่วโมง [71]

Rodrigues et al. (2015) ศึกษาเกี่ยวกับวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก จากใบมะรุม โดยใช้วิธีการสกัด 2 แบบ ดังนี้ แบบดั้งเดิมหรือการสกัดเย็น (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เวลาในการสกัด ได้แก่ 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง และแบบใช้คลื่นเสียง (Ultrasound) เข้าร่วมในการสกัด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดทั้ง 2 วิธีนั้น ได้แก่ 100, 70 และ 50 % เมทานอล, 100, 70 และ 50 % เอทานอล และ 100, 70 และ 50 % อะซิโตน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี folin-ciocalteu assay และศึกษาชนิดของสารประกอบ ฟีนอลิกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง (High pressure liquid chromatography: HPLC) จากการศึกษพบว่าทั้งการสกัดแบบวิธีดั้งเดิม และการสกัดที่มีการใช้คลื่นเสียงเข้าช่วย โดยมีตัวทำละลาย คือ 50% เอทานอล ได้สารประกอบ ฟีนอลิกจากใบมะรุมมากที่สุด เท่ากับ 27 ± 2 และ 47 ± 4 มิลลิกรัม gallic acid eq./1 กรัม สารตั้งต้น ตามลำดับ และจากผลของเทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 59 ชนิด ซึ่งสารฟลาโวนอยด์มีมากที่สุด 30 ชนิด [72]

Oboh et al. (2015) วิจัยเกี่ยวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์จาก ใบมะรุม เพื่อใช้เป็นกุญแจยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (Erectile dysfunction) และภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ในเนื้อเยื่อองคชาติ (Penile tissues) ของหนู โดยศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant properties) และผลของการยับยั้งของสารสกัดจากใบมะรุม ได้แก่ สารประกอบ ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ด้วยการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย สกัดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที กรอง และนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี folin-ciocalteu assay ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร โดยใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน และชนิดของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูง (High pressure liquid chromatography: HPLC) นอกจากนี้วิเคราะห์ฤทธิ์ของการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยการออกฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) และไฮดรอกซิล (Hydroxyl) รวมทั้งทดสอบความสามารถในการแย่งจับ Fe^{2+} (Metal chelating activity assay) จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 15.2 ± 1.6 mg/100 g (gallic acid eq.) โดยมีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ gallic acid catechin chlorogenic acid และ kaempferol เป็นต้น และยังมีสารที่สำคัญคือมีปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 3.1 ± 0.1 mg/100 g (quercetin eq.) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) และไฮดรอกซิล (Hydroxyl) รวมทั้งทดสอบความสามารถในการแย่งจับ Fe^{2+} มีค่าเท่ากับ 1.36 ± 0.09 , 0.52 ± 0.07 และ 0.38 ± 0.08 mg/ml ตามลำดับ [73]

Ilyas et al. (2015) เปรียบเทียบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน คุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ของน้ำชาจากใบ และเมล็ดของมะรุม วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการตามมาตรฐาน AOAC 2000 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี folin-ciocalteu assay และปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity จากการทดลองพบว่า น้ำชาจากใบมะรุมมีเยื่อใยมากกว่าเมล็ดมะรุม ในขณะที่มีปริมาณโปรตีนมากกว่าเมล็ดมะรุม และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของน้ำชาที่ได้จากใบมะรุม (9535 ± 57.74 mg/100 g สารตั้งต้น) ซึ่งมีมากกว่าน้ำชาที่ได้จากเมล็ดมะรุม (4822 ± 54.74 mg/100 g สารตั้งต้น) รวมทั้งปริมาณ ฟลาโวนอยด์ของน้ำชาที่ได้จากใบมะรุม (6543 ± 59.75 mg/100 g สารตั้งต้น) มีมากกว่าน้ำชาจากเมล็ดมะรุม (958.34 ± 11.53 mg/100 g สารตั้งต้น) นอกจากนี้พบว่า น้ำชาจากใบมะรุมมีฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน ($87.02 \pm 0.99\%$) มากกว่าชาจากเมล็ดมะรุม ($34.050 \pm 0.99\%$) [74]

Fitriana et al. (2016) ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจาก มะรุม ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอล (Methanol) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) และเฮกเซน (N-hexane) นอกจากนี้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity และวิธีการทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2,2'-azinobis (3-ethy-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) จากการวิจัยพบว่าสารสกัดจากมะรุมที่

สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดเท่ากับ 49.30 $\mu\text{g/ml}$ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดเท่ากับ 11.73 $\mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี ABTS [75]

Hamed et al. (2017) วิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบมะรุม ซึ่งใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ 85% เมทานอล (Methanol) อีเทอร์ (Ether) เมทิลีนคลอไรด์ (Methylene chloride) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) บิวทานอล (N-butanol) และน้ำกลั่น โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี folin-ciocalteu assay และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค นิวเคลียร์ แมกเนติก เรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) รวมทั้งวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity จากการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมที่ใช้ตัวทำละลายบิวทานอล จะมีค่าของ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ $309.52 \pm 1.25 \text{ mg/1 g}$ (gallic acid eq.) โดยมีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ chlorogenic acid, niazirin, 3,4-dihydroxyl- β -phenylethoxy- α -L-rhamnopyranosyl-[1 \rightarrow 2]- α -L-rhamnopyranosyl-[1 \rightarrow 3]-4-*o*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside, gallic acid, taxifolin และ benzyl-carbamothioethionate นอกจากนี้สารสกัดของใบมะรุมที่ใช้บิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด เท่ากับ $316.43 \pm 1.20 \text{ mg ascorbic acid eq./1 g}$ สารตั้งต้น [76]

2.7 วิธีวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับภาวะเครียดออกซิเดชันได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทางเทคนิควิธีการใหม่ๆ ได้รับการคิดค้น และพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อตอบสนองต่อความรู้เชิงลึกที่สัมพันธ์กับการเกิดภาวะนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาเพื่อนำไปสู่ความเข้าใจในกลไกการเกิด และพัฒนาวิธีการป้องกันรักษาโรค ตลอดจนการคิดค้นสารหรือยาตัวใหม่โดยอาศัยแนวคิดพื้นฐานจากกลไกการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จากคุณสมบัติของอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวสูง (Highly reactive) และมีอายุสั้น (Short-life) ประมาณ 10^{-9} วินาที ทำให้การตรวจจับอนุมูลอิสระเป็นเรื่องที่แทบจะเป็นไปไม่ได้ ดังนั้น เพื่อให้การศึกษาคูณสมบัติ และการเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระในสภาวะต่างๆ สามารถทำได้นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงวิธีการ และเทคนิคต่างๆ ในการติดตามการเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระที่นำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันทั้งภายใน และภายนอกร่างกาย ในปัจจุบันแนวทางสำหรับการตรวจวัดว่ามีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และสัมพันธ์กับพยาธิสภาพต่างๆ หรือไม่นั้น [67] สามารถแบ่งได้เป็น 3 แนวทางได้แก่

- 1) การวัดการสร้างอนุมูลอิสระ (Measurement of free radical formation) เป็นการติดตามวัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยตรง (Direct measurement) เพื่อประเมินว่าภายในสภาวะที่สนใจนั้นมีการสร้างอนุมูลอิสระหรือไม่ เป็นอนุมูลอิสระชนิดใด เกิดขึ้นเมื่อไร มากหรือน้อยเท่าไร

- 2) การวิเคราะห์ตัวชี้วัดออกซิเดชัน (Determination of oxidation biomarkers) เป็นการวัดความเสียหายหรือร่องรอยที่เกิดจากอนุมูลอิสระ เพื่อประเมินการเกิดภาวะตึงเครียด

ออกซิเดชันที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ โดยอาศัยการติดตามการเกิดร่องรอย (Footprints) อันเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาในรูปแบบต่างๆ ข้อมูลที่ได้จึงสามารถตอบคำถามเกี่ยวกับการเกิดขึ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันตลอดจนระดับของความเสียหายที่เกิดขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระที่กระทำต่อโครงสร้าง และองค์ประกอบของเซลล์ร่างกาย เช่น ไขมัน ดีเอ็นเอ และโปรตีน

3) การวิเคราะห์ความสามารถสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant capacity assays) เพื่อการประเมินประสิทธิภาพในแง่ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ หรือลดภาวะเครียดออกซิเดชันของสารที่สนใจ ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปของการประเมินประสิทธิภาพโดยตรง หรือข้อมูลเชิงเปรียบเทียบของสารต้านออกซิเดชันต่างๆได้

ในงานวิทยานิพนธ์นี้เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ได้แก่ การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2, 2'-azinobis (3- ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay) และการทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} (Metal chelating activity assay) เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจวัดที่ดี และเหมาะสมจะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องเที่ยงตรง

2.7.1 การวิเคราะห์ความสามารถสารต้านออกซิเดชัน

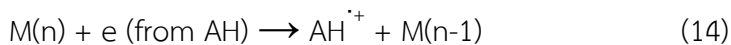
หลักการวิเคราะห์ความสามารถสารต้านออกซิเดชันโดยทั่วไป [67] เมื่อพิจารณาทั้งในแง่จุลศาสตร์ และการเกิดปฏิกิริยาเคมีสามารถจำแนกลักษณะการวิเคราะห์ออกได้เป็น 2 รูปแบบขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

กลไกที่หนึ่ง การวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom transfer; HAT) ปฏิกิริยาส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบของ HAT ปฏิกิริยา competitive reaction คือมีการแย่งกันระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับสารตั้งต้น (Substrate) ในการเข้าจับกับ peroxy radicals ที่ถูกสร้างจากการสลายตัวของสารกลุ่มเอโซ (Azo compounds) ดังสมการที่ (12) และ (13) ตัวอย่างเทคนิคการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการ HAT เช่น การยับยั้งการเกิด autoxidation ของ low-density lipoprotein, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) และ crocin bleaching assays เป็นต้น



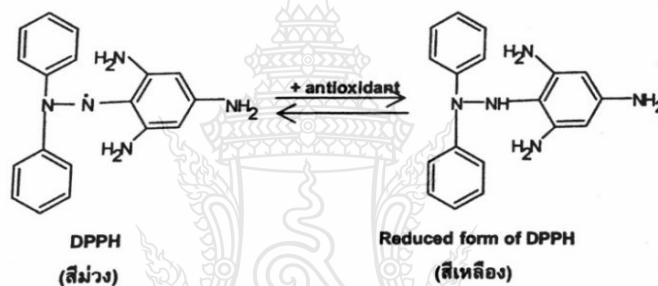
กลไกที่สอง วิเคราะห์โดยอาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอน (Electron transfer; ET หรือ Single electron transfer; SET) เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วัดความสามารถสารต้านออกซิเดชันในการให้อิเล็กตรอน (Reduction reaction) แก่สารออกซิแดนซ์ นำไปสู่การเปลี่ยนสีเมื่อสารออกซิแดนซ์นั้นได้รับอิเล็กตรอน (Reduced) ดังสมการเคมีที่ (14) ระดับของสีที่เปลี่ยนแปลงไปมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันโดยมี ตัวอย่างเทคนิคของการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการในการต้านออกซิเดชันดังนี้ เช่น การทดสอบด้วย อนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2, 2'-azinobis (3- ethyl-benzothiazoline-6-

sulfonate (ABTS) และมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay)



2.7.1.1 การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [67], [66]

อนุมูล DPPH (DPPH radical, DPPH[•]) มีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือเป็นอนุมูลอิสระชนิด organic nitrogen radical ที่มีความคงตัว และสามารถดูดกลืนแสงในช่วง UV-vis ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] เกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะมีการเปลี่ยนสีคือสีม่วงเข้มของ DPPH[•] จะจางลงเป็นสีเหลือง ดังภาพที่ 2.4 ซึ่งการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นนี้สามารถติดตามวัดได้ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer



ภาพที่ 2.4 การเปลี่ยนอนุมูล DPPH ภายหลังเกิดปฏิกิริยารีดักชัน และมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ที่มา ไมตรี และคณะ (2555) [67]

วิธีการทดสอบด้วย DPPH ทำได้โดยการเตรียมสารละลาย DPPH (ละลาย DPPH ในเมทานอล) ผสมกับสารทดสอบ และวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร หลังตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นคำนวณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารทดสอบในรูปร้อยละความสามารถในการกำจัด DPPH[•] หรือเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน

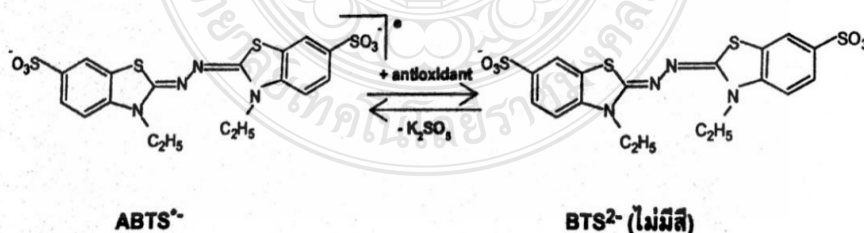
เทคนิคการทดสอบด้วย DPPH แม้จะมีข้อดีคือง่ายต่อการวิเคราะห์ สะดวก และรวดเร็ว ให้ความถูกต้องและมีความสามารถในการประเมินค่าสูง แต่ก็มีข้อเสีย และข้อจำกัดหลายประการ เช่น ไม่สามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์หาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของอาหารที่มีโปรตีนสูงได้ เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ และเนื่องจาก DPPH[•] เป็นอนุมูลไนโตรเจน ที่มีอายุค่อนข้างยาวเมื่อเทียบกับอนุมูลอิสระทั่วไป จึงมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปบ้างจากอนุมูลอิสระที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาสูงรวมถึง peroxy radical ที่พบได้ในปฏิกิริยาลิพิด เปอร์ออกซิเดชัน จึงพบว่าสารต้านออกซิเดชันหลายตัวสามารถทำปฏิกิริยากับ peroxy radical ได้อย่าง

รวดเร็วแต่ไม่ทำปฏิกิริยาหรือทำปฏิกิริยาช้ามากกับ DPPH[•] ในกรณีเช่นนี้การประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธีการทดสอบด้วย DPPH จะทำให้ได้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้สารต้านออกซิเดชันบางตัว เช่น eugenol สามารถทำปฏิกิริยากับ DPPH และเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ทำให้ความสามารถต้านออกซิเดชันของ eugenol หรือสารพวก phenol อื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกันมีค่าต่ำกว่าความเป็นจริงได้

2.7.1.2 การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2, 2'-azinobis (3- ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) [67]

เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีหรือโครงสร้างแตกต่างกัน ทำให้มีความจำเพาะในการตอบสนองต่อปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดสอบต่างกัน เช่น กรดคาเฟอิกมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างสูงแต่มีค่าการต้านอนุมูล ABTS ต่ำ ในทางตรงกันข้ามกรดพาราควมาริกมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำมาก แต่ค่าการต้านอนุมูล ABTS ค่อนข้างสูง ดังนั้นการทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2, 2'-azinobis (3- ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างพืช สัตว์ หรืออาหาร โดยอาศัยหลักการปลดปล่อย ABTS radical จากสารละลาย ABTS เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสี ซึ่งการเตรียมอนุมูลของ ABTS^{•-} (ABTS radical) สามารถเตรียมได้ 2 วิธี ได้แก่

1) การทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate; K₂SO₅) ทำได้โดยการละลาย ABTS ammonium ในน้ำ และเติมโพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ซัลเฟตออกซิเดชัน (Persulfate oxidation) จนได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งเป็นการปลดปล่อย ABTS^{•-} จากนั้นเจือจางด้วยเอทานอล หรือบัฟเฟอร์ (pH 7.4) จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และทดสอบโดยผสมสารละลายที่เตรียมได้กับสารต้านออกซิเดชันหรือสารที่ต้องการทดสอบ อ่านค่าการดูดกลืนแสง ณ จุดเวลาต่างๆ การทำปฏิกิริยาระหว่าง ABTS^{•-} กับสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะทำให้ปริมาณ ABTS^{•-} ลดลง ผลรวมลดลงหรือสีจางลง ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 การเกิดปฏิกิริยาของ ABTS^{•-} กับสารต้านออกซิเดชัน และการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 734 นาโนเมตร เพื่อการประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

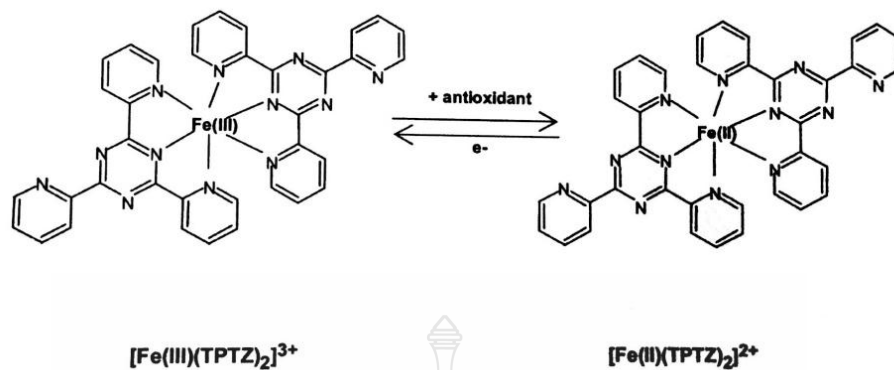
ทีมา ไมตรี และคณะ (2555) [67]

2. การทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำได้โดยการเตรียม ABTS กับ peroxidase (Metmyoglobin) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิดการปลดปล่อยอนุมูลอิสระประจุบวกกับ $ABTS^{\cdot+}$ ซึ่งมีสีน้ำเงิน-เขียว และมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร การทดสอบทำได้โดยผสมสารละลายที่ได้กับสารต้านออกซิเดชัน และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจางลงซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน แสดงถึงสารต้านออกซิเดชันสามารถลด หรือ กำจัด (Scavenge) ปริมาณอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$

จากการทำปฏิกิริยาของ ABTS ทั้งสองแบบ สามารถวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่แสดงในรูปการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายโดยเครื่องมือ spectrophotometer ข้อดีของวิธีนี้คือ $ABTS^{\cdot+}$ มีความคงตัวสูงทั้งในสารละลายน้ำ และเอทานอล สามารถใช้ได้ในช่วงความเป็นกรด-เบสที่กว้าง และเมื่อเปรียบเทียบกับ trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐานแล้วสามารถนำไปสู่การแสดงผลในรูปของค่า trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ได้ ในกระบวนการศึกษาโดยใช้เทคนิคใหม่ๆ เช่น flow injection analysis ที่มีพื้นฐานเกี่ยวกับการวัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่องมือ spectrophotometer แต่ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยกว่า และสามารถพัฒนาไปสู่รูปแบบอัตโนมัติ เพื่อการตรวจวัดหรือคัดกรองความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างจำนวนมากได้ในเวลาเดียวกัน

8.7.1.3 ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay) [67]

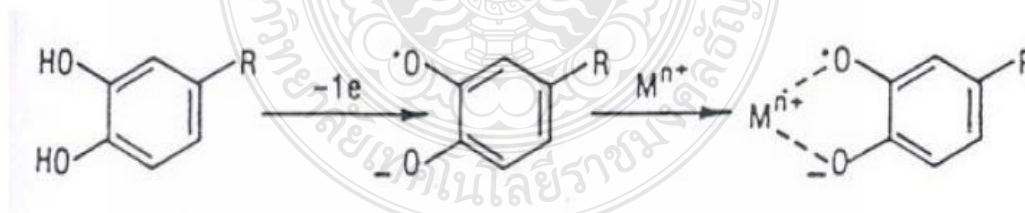
เป็นวิธีการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันตามหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารออกซิเดนต์ กับสารต้านออกซิเดชัน เมื่อสารต้านออกซิเดชันถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งทั้งสองรูปแบบของสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์รัส $Fe-(TPTZ)_2$ มีการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน เมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 2.6 ดังนั้นปริมาณที่เกิดขึ้นของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ จึงสามารถใช้ในการประมาณความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่สารออกซิเดนต์ได้ในรูปของ FRAP value โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulfate; $FeSO_4$) ที่ใช้ในการสร้าง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$



ภาพที่ 2.6 การทำปฏิกิริยาระหว่าง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{3+}$ กับสารต้านออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยนเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่สามารถติดตามวัดการเปลี่ยนสีที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ที่มา ไมตรี และคณะ (2555) [67]

2.7.1.4 การทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} (Metal chelating activity assay) [77]

นอกจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่กล่าวมาข้างต้น ยังมีวิธีวิเคราะห์ความสามารถสารต้านออกซิเดชันที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดย Loizzo et al. (2010) กล่าวว่าโลหะหนัก ได้แก่ Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะเร่งการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical ดังแสดงในภาพที่ 2.7 ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้สามารถช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น



ภาพที่ 2.7 กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟราโวนอยด์ ที่มา Loizzo et al. (2010) [77]

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีทำการทดลอง

3.1 วัตถุประสงค์ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุประสงค์

ใบมะรุม

ฝักมะรุม

เปลือกมะรุม

เนื้อมะรุม

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.2.1. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร

2. ขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร และ 100

มิลลิลิตร

3. Autopipette / Micropipette

4. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิลิตร

5. กรวยกรอง

6. แท่งแก้ว

7. คิวเวทท์

8. กระดาษกรองเบอร์ 1

9. หลอดทดลองขนาดเล็ก

10. ขวดน้ำกลั่น

11. เครื่องครัว

12. Moisture Can

13. Crucible

14. กระบอกตวง

3.1.2.2. เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์

1. เครื่องวิเคราะห์ความชื้น

2. ตู้อบลมร้อน

3. ตู้ดูดควัน

4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

7. เครื่อง Mixer

3.1.3 เอนไซม์

3.1.3.1 เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase)

3.1.3.2 เอนไซม์นิวเทรส (Neutrase)

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1. สารเคมีที่สกัดตัวอย่าง

1. น้ำกลั่น

2. เอทานอล

3.1.4.2. สารเคมีที่วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลรวม

1. Folin-Ciocalteu Reagent

2. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

3. กรดแกลลิก

4. น้ำกลั่น

3.1.4.3. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ DPPH

1. Di(Phenyl)-(2,4,6-Trinitrophenyl)Iminoazanium (DPPH)

2. เอทานอล

3. 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid

(Trolox)

4. น้ำกลั่น

3.1.4.4. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การรีดิวซ์เหล็กเฟอริก

1. Sodium Acetate

2. น้ำกลั่น

3. กรดอะซิติก

4. กรดไฮโดรคลอริกคลอไรด์

5. 2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-s-Triazine (TPTZ)

6. Iron(III) Chloride Hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

7. Iron(II) Sulfate Heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

3.1.4.5. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การแย่งจับกับ Fe^{2+}

1. $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

2. NaOH

3. น้ำกลั่น

4. Dinatrium-4-[3-Pyridin-2-yl-6-(4-Sulfonatophenyl)-1,2,4-Triazin-

5-yl]Benzosulfonat (Feozine)

5. 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-Diyl)dinitrilo)Tetraacetic Acid (EDTA)

3.1.4.6. สารเคมีสำหรับวิธีการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

1. ABTS 2,2' -azinobis (3-ethy-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS)

2. Na_2HPO_4
 3. HCL
 4. น้ำกลั่น
 5. โฟแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต
- 3.1.4.7 สารเคมีของการวิเคราะห์โปรตีน
 1. Bovine serum albumin; BSA
 - 3.1.4.8 สารเคมีการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซท
 1. Trichloromethane; CHCl_3
 2. 2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid; TNBS
 3. L- 2 – Amino – 4 – methyl pentanoic acid; L-leucine

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบตั้งต้นและการหาค่าประกอบทางเคมีของมะรุม

3.2.1.1 การเตรียมวัตถุดิบตั้งต้น

คัดแยกใบมะรุมโดยเลือกใบที่มีสีเขียวสด ซึ่งใบมะรุมที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากสวนในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ปี พ.ศ. 2561 ส่วนฝักมะรุมได้มาจากตลาดไท จังหวัดปทุมธานี ปี พ.ศ. 2561 เลือกฝักที่สมบูรณ์มาล้างทำความสะอาด จากนั้นแยกมะรุมออกเป็น 3 ส่วน คือ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม นำอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปบด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตรเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัด และวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมะรุม

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต [16]

3.2.1.3 ศึกษาตัวทำละลายในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆของมะรุมด้วยตัวทำละลาย

นำตัวอย่างใบมะรุม เมล็ด เนื้อ เปลือก อบแห้งสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอลเข้มข้น 50 และ 90% ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 0.25:10 (w/v) เขย่าสารตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.2.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Folin-ciocalteu method)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดดัดแปลงวิธีมาจาก Kähkönen และคณะ (1999) เตรียมสารละลาย folin-ciocalteu reagent เข้มข้น 0.2 M โดยปิเปต Folin-Ciocalteu reagent 2 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายโซเดียม

คาร์บอนเนตเข้มข้น 75 g/l โดยซัง โซเดียมคาร์บอนเนต 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 µg/ml โดยซัง 0.0100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-100 µg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติม folin-ciocalteu reagent 2.5 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอนเนต 2.0 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร [78]

3.2.2 ศึกษาชนิดของเอนไซม์ในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ทางการค้า

การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ทางการค้า นำตัวอย่างใบมะรุ่มอบแห้งจากตอนที่ 1 จำนวน 10 กรัม ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 90 มิลลิลิตร (เอนไซม์อัลคาเลส = สารละลาย Tis -HCl, pH 8, 65 องศาเซลเซียส , เอนไซม์นิวเทรส = สารละลาย Tis-HCl, pH 7, 50 องศาเซลเซียส) อัตราส่วนของเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรสต่อตัวอย่างใบมะรุ่มแห้ง 0.25:100 และ 0.5:100 (v/w) ตามลำดับโดยศึกษาที่เวลาการย่อยสลาย 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000xg เป็นเวลา 40 นาที นำส่วนใสที่ได้แต่ละช่วงเวลารย่อยสลายไปวิเคราะห์คาร์ระดับการย่อยสลาย จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิ และ pH

3.2.2.1 การวิเคราะห์คาร์ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH)

คาร์ระดับการย่อยสลายวิเคราะห์ตามวิธีการของ Adler-Nissen (1979) [79] ผสมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมาณ 50 ไมโครลิตรกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ต่อปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย TNBS ที่ความเข้มข้น 0.05% pH 8.2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 N ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดคาร์ระดับการย่อยสลายที่มีค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ใช้สารละลาย L-leucine เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณคาร์ระดับการย่อยสลาย (%) ตามวิธีของ Benjakul et al. (1997) [80]

3.2.2.2 ศึกษาตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนจากใบมะรุ่มด้วยตัวทำละลาย

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตัดแปลงวิธีมาจาก Grimsley et al. (2003) นำโปรตีนที่สกัดจากมะรุ่มปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค UV spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 200-960 nm จากนั้นเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Protein standard) ด้วยการละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin : BSA) 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 mg/ml ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้ในการสกัดปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค UV spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 200-960 นาโนเมตร และทำกราฟมาตรฐาน [81]

3.3.3 ศึกษาการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.3.3.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity

วิธีการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงวิธีการจาก Zhang et al. (2007) เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร DPPH 0.0147 กรัม ละลายด้วย Ethanol และปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox เข้มข้น 500 µg/ml โดยชั่งสาร 0.0504 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และเอทานอล (1:1) ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-10 µg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง จำนวน 1.0 มิลลิลิตรเติม DPPH 1.0 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของตัวอย่างในรูปความเข้มข้นของ Trolox (mg Trolox /g) [82]

3.3.3.2 การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS)

วิธีการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดัดแปลงวิธีการจาก Re et al. (1999) อนุมูล ABTS ถูกสร้างขึ้นด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยการผสมสาร ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2.45 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) เก็บไว้ที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS วิเคราะห์โดยเริ่มเจือจางสารละลายอนุมูลให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 (± 0.02) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) ปริมาตร 1980 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมที่ค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของตัวอย่างในรูปความเข้มข้นของ Trolox (มิลลิโมลาร์) [83]

3.3.3.3 ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกดัดแปลงจากวิธีการของ Benzie et al. (1996) ดังนี้ ผสมสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตรทที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย FeCl₃·6H₂O ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายดังกล่าวที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปใช้ (FRAP reagent) ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้สารละลายตัวอย่างสกัดจำนวน 40 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ FRAP reagent ปริมาตร 1800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร รายงานความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของตัวอย่างแสดงในรูปของความเข้มข้น FeSO₄·7H₂O (มิลลิโมลาร์) [84]

3.3.3.4 ทดสอบความสามารถในการแย่งจับ Fe^{2+} (Metal chelating activity assay) การทดสอบความสามารถในการแย่งจับ Fe^{2+} ดัดแปลงวิธีการจาก Decker et al. (1990) โดยใช้สารสกัดจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นจำนวน 1400 ไมโครลิตรและสารละลาย $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ เข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร รายงานความสามารถในการแย่งจับ Fe^{2+} ในรูปของความเข้มข้น EDTA (มิลลิโมลลาร์) [85]

3.3.4 ศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิ และ pH

3.3.4.1 เลือกสภาวะที่ให้ค่าความสามารถด้านออกซิเดชันสูงที่สุดมาทดสอบความคงตัวของอุณหภูมิ และ pH โดยบ่มตัวอย่างสารละลายที่อุณหภูมิ 25, 37, 50, 60, 70, 80, 90, และ 100 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ และ 121 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์ค่าความสามารถด้านออกซิเดชันของตัวอย่างที่เหลือหลังจากให้ความร้อน

3.3.4.2 ในการศึกษาความคงตัวของ pH โดยบ่มตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที [pH 4 (0.1M sodium acetate), pH 7 (0.1 M phosphate buffer), และ pH 10 (0.1 M sodium tetraborate)] จากนั้นวิเคราะห์ค่าความสามารถด้านออกซิเดชันของตัวอย่าง

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหาร สาขาเทคโนโลยีอาหาร และอาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตรังสิต

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมะรุ้ม การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆของมะรุ้มด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่างๆของมะรุ้ม

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่างๆของมะรุ้ม (ใบ เปลือก เนื้อ และ เมล็ดมะรุ้ม) เมื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี โดยความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เส้นใย และ คาร์โบไฮเดรต พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่างๆของมะรุ้ม

องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)	ใบมะรุ้ม	เปลือกมะรุ้ม	เนื้อมะรุ้ม	เมล็ดมะรุ้ม
ความชื้น	4.77 ^c ± 0.01	7.22 ^a ± 0.02	4.44 ^d ± 0.04	5.40 ^b ± 0.07
เถ้า	7.50 ^b ± 0.01	7.03 ^c ± 0.00	4.40 ^d ± 0.00	9.23 ^a ± 0.07
โปรตีน	30.56 ^a ± 0.59	14.92 ^c ± 0.05	13.91 ^d ± 0.60	21.10 ^b ± 0.18
ไขมัน	1.19 ^c ± 0.00	1.58 ^b ± 0.03	1.23 ^c ± 0.01	2.64 ^a ± 0.05
เส้นใย	12.53 ^c ± 0.04	22.28 ^b ± 0.37	30.39 ^a ± 0.36	12.83 ^c ± 0.05
คาร์โบไฮเดรต	43.45 ^d ± 0.64	46.95 ^b ± 0.34	45.63 ^c ± 0.28	48.80 ^a ± 0.38

หมายเหตุ : ภาษาอังกฤษเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวนอนหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของมะรุ้ม พบว่าสมบัติทางเคมี พบว่า ใบ เปลือก เนื้อ และเมล็ดมะรุ้ม) มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 4.44-7.22 โดยเปลือกมะรุ้มมีค่าความชื้นสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 7.22 รองลงมาคือส่วนเมล็ดมะรุ้ม คิดเป็นร้อยละ 5.40 ปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงร้อยละ 4.40-9.23 โดยเมล็ดมะรุ้มมีค่าปริมาณเถ้าสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 9.23 รองลงมาคือใบมะรุ้ม คิดเป็นร้อยละ 7.50 ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 13.91-30.56 โดยใบมะรุ้มมีค่าปริมาณโปรตีนสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 30.56 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Price, 2000; Foidl et al., 2001 และ Richter et al., 2003 พบว่าใบมะรุ้มแห้งจะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 25.1-29.0 [86], [87], [88] จากการทดลองพบว่าปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 1.19-2.64 โดยเมล็ดมะรุ้มมีค่าปริมาณไขมันสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 2.64 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Compaoré et al. (2011) ที่พบว่าในเมล็ดมะรุ้มมีปริมาณไขมันมากที่สุดเท่ากับ 43.56 กรัม/100 กรัม ปริมาณเส้นใยอยู่ในช่วงร้อยละ 12.53-30.39 โดยเนื้อมะรุ้มจะมีค่าปริมาณเส้นใยสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 30.39 รองลงมาคือเปลือกมะรุ้มคิดเป็นร้อยละ 22.28 และปริมาณ

คาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วงร้อยละ 43.45-48.80 โดยเมล็ดมะรุมมีค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 48.80 รองลงมาคือเปลือกมะรุมคิดเป็นร้อยละ 46.95 ตามลำดับ [14]

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) จากส่วนต่างๆของมะรุม (ใบ เปลือก เนื้อ เมล็ด) ด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอลเข้มข้น 50 และ 95%

จากการทดลองการสกัดใบ เมล็ด เปลือก และเนื้อของมะรุม ด้วยตัวทำละลายเป็น น้ำ เอทานอลเข้มข้น 50 และ 95%ในการสกัด ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน จากทุกส่วนมะรุม (ใบ เปลือก เนื้อ และเมล็ดมะรุม) ที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเอทานอลเข้มข้น 50% สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงสุด และสูงกว่าการใช้น้ำ และเอทานอลเข้มข้น 95% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Spigno et al. (2007), Rodriguez et al. (2015), Naeem et al. (2012), Zhang et al. (2007), และVongsak et al. (2013) ซึ่งพบว่า ตัวทำละลายที่มีเอทานอลเข้มข้น 50 หรือ 70% สามารถสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้มากกว่าการใช้น้ำหรือเอทานอลบริสุทธิ์ [89], [72], [69], [90], [70]

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจากใบ เปลือก เนื้อ และเมล็ดมะรุม

ตัวอย่างมะรุม	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg gallic acid eq./g)		
	น้ำ	50% เอทานอล	95% เอทานอล
ใบ	5.10 ^{bd} ± 0.55	8.05 ^{ad} ± 0.05	1.02 ^{cc} ± 0.01
เปลือก	12.95 ^{ba} ± 0.10	13.81 ^{aa} ± 0.22	2.90 ^{ca} ± 0.01
เนื้อ	9.88 ^{bb} ± 0.22	12.47 ^{ac} ± 0.44	2.65 ^{cb} ± 0.06
เมล็ด	8.20 ^{bc} ± 0.17	13.59 ^{ab} ± 0.02	2.60 ^{cb} ± 0.14

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวนอน และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบที่ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดชนิดเดียวกัน พบว่าเปลือกมะรุมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่สุทธรองลงมาคือ เมล็ด เนื้อ และใบมะรุม ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลอง เปลือก และเมล็ดมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดคิดเป็น 13.81 และ 13.59 mg gallic acid eq./g ตามลำดับ รองลงมาคือ ตัวอย่างเปลือกมะรุมที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดคิดเป็น 12.95 mg gallic acid eq./g จากการศึกษาวิจัยของอเนก และคณะ (2560) พบว่าฝักมะรุมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คิดเป็น 0.74 mg gallic acid eq./g sample อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานที่เกี่ยวกับปริมาณหรือชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆของฝักมะรุม [91]

4.1.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆของมะรุ้ม (ใบ เปลือก เนื้อ เมล็ด) ด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอลเข้มข้น 50 และ 95%

4.1.3.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แสดงดังตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน พบว่าในตัวอย่างใบ และเปลือกมะรุ้มที่ใช้เอทานอลเข้มข้น 50% ในการสกัด สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ส่วนตัวอย่างเนื้อ และเมล็ดมะรุ้ม พบว่าการใช้น้ำ สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าการใช้เอทานอลเข้มข้น 50% และ เอทานอลเข้มข้น 95% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจากใบ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุ้ม

ตัวอย่างมะรุ้ม	DPPH assay (mg Trolox eq./g)		
	น้ำ	50% เอทานอล	95% เอทานอล
ใบ	10.94 ^{bA} ± 0.24	17.51 ^{aA} ± 2.38	2.75 ^{cA} ± 0.05
เปลือก	1.96 ^{bD} ± 0.07	3.29 ^{aBC} ± 0.15	0.54 ^{cC} ± 0.09
เนื้อ	9.17 ^{aB} ± 0.14	5.04 ^{bB} ± 0.06	0.86 ^{cB} ± 0.06
เมล็ด	3.01 ^{aC} ± 0.43	0.86 ^{aC} ± 0.03	0.30 ^{bD} ± 0.01

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวนอน และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดชนิดเดียวกัน พบว่า สารสกัดจากใบมะรุ้มด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด รองลงมาคือ เนื้อ เปลือก และเมล็ดมะรุ้ม ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบมะรุ้มที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดคิดเป็น 17.51 mg Trolox eq./g รองลงมาคือ สารสกัดจากใบมะรุ้มที่สกัดด้วยน้ำ คิดเป็น 10.94 mg Trolox eq./g ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงว่า ในตัวอย่างใบมะรุ้มมีสารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ผ่านกระบวนการถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอม (HAT) ได้ดีที่สุดในลำดับ [92]

4.1.3.2 การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2,2'-azinobis (3-ethy-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS)

จากการทดลองการสกัด ใบ เปลือก เนื้อ และ เมล็ดมะรุม ด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอลเข้มข้น 50 และ 95% ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50% สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS จากใบได้สูงที่สุด ($P \leq 0.05$) และสูงกว่าการใช้น้ำ และเอทานอลเข้มข้น 95% ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vongsak et al. (2013) ว่าตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50% หรือ 70% เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่ช่วยในการยับยั้งอนุมูลอิสระจากใบมะรุมได้มากกว่าการใช้น้ำหรือเอทานอลบริสุทธิ์ในการสกัด [70]

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจากใบ เมล็ด เนื้อและเปลือกมะรุม

ตัวอย่างมะรุม	ABTS assay (mg Trolox eq./g)		
	น้ำ	50% เอทานอล	95% เอทานอล
ใบ	39.23 ^{bA} ± 0.24	42.97 ^{aA} ± 2.38	14.64 ^{CA} ± 0.05
เปลือก	17.29 ^{dD} ± 0.07	13.97 ^{bC} ± 0.15	4.58 ^{CB} ± 0.09
เนื้อ	23.23 ^{aC} ± 0.14	19.47 ^{bB} ± 0.06	4.41 ^{CB} ± 0.06
เมล็ด	29.49 ^{aB} ± 0.43	12.78 ^{bD} ± 0.03	3.67 ^{bC} ± 0.01

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแต่ละแถว และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหนือตัวเลขที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการใช้วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH [92] โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์จากสกัดใบมะรุมได้มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์หรือให้ไฮโดรเจนกับ $ABTS^{\cdot+}$ ซึ่งเป็นสารสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร กลายเป็นสารที่ไม่มีสี [83] โดยจากงานวิจัยของ Sreelatha et al. (2009) ได้รายงานผลว่า ใบมะรุมมีกรดแอสคอร์บิก 5.81-6.60 mg/g โทโคฟีรอล 5.63-6.53 μ g/g และ แคโรทีนอยด์ทั้งหมด 85.20-92.38 mg/g ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน [93]

4.1.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay)

การตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (FRAP assay) เป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ (Ferric tripyridyltriazine) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์โดยสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก Fe^{2+} -TPTZ (Ferrous tripyridyltriazine) ซึ่งให้ผลเป็นสีน้ำเงินรายงานผลเป็น ค่า FRAP value ในหน่วย mg ferrous eq./g [94]

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจากใบ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุ้ม

ตัวอย่างมะรุ้ม	FRAP assay (mg ferrous eq./g)		
	น้ำ	50% เอทานอล	95% เอทานอล
ใบ	0.32 ^{bA} ± 0.00	0.59 ^{aA} ± 0.00	0.15 ^{cA} ± 0.01
เปลือก	0.11 ^{bC} ± 0.00	0.13 ^{aC} ± 0.02	0.03 ^{cC} ± 0.01
เนื้อ	0.11 ^{bC} ± 0.00	0.23 ^{aB} ± 0.04	0.04 ^{cBC} ± 0.00
เมล็ด	0.13 ^{aB} ± 0.00	0.13 ^{aC} ± 0.01	0.05 ^{bB} ± 0.00

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวนอน และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (ตารางที่ 4.5) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน การใช้เอทานอลเข้มข้น 50% ในการสกัด สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกสูงสุด รองลงมาคือใช้น้ำ และเอทานอลเข้มข้น 95% ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากใบ และเนื้อมะรุ้มมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกสูงสุด รองลงมา เปลือก และเมล็ดมะรุ้มตามลำดับ จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบมะรุ้มที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก สูงสุดคิดเป็น 0.59 mg ferrous eq./g รองลงมาคือ สารสกัดจากใบมะรุ้มที่สกัดด้วยน้ำ คิดเป็น 0.32 mg ferrous eq./g จากผลการทดลองแสดงว่าในตัวอย่างใบ และเมล็ดมะรุ้มมีบทบาทสำคัญในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก จากการศึกษพบว่า สารที่พบในเมล็ดมะรุ้มเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น catechin, epicatechin, และ quercetin เป็นต้น [95]

4.1.3.4 การทดสอบความสามารถในการแย่งจับ Fe²⁺ (Metal chelating activity assay)

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ต้องการทดสอบโดยอาศัยความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe²⁺ เมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ Fe²⁺ แล้วอยู่ในรูป Ferrozine-Fe²⁺ complex ซึ่งจะให้สีแดง และถ้าสารที่ต้องการทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe²⁺ จะอยู่ในรูปของ Antioxidant-Fe²⁺ complex แล้วจะทำให้สีแดงของ Ferrozine-Fe²⁺ complex จางลงได้ [96] ซึ่งวิธีการนี้จัดเป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันในบทบาทการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแบบทุติยภูมิ (secondary antioxidant) โดยสารที่ต้องการทดสอบจะทำหน้าที่จับโลหะ (Fe²⁺) ที่มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะกับสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้โลหะไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยผลการศึกษาประสิทธิภาพในการจับโลหะในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจาก ใบ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการแย่งจับ Fe²⁺ ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจาก ใบ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม

ตัวอย่างมะรุม	Metal chelating activity assay (µg EDTA eq./g)		
	น้ำ	50% เอทานอล	95% เอทานอล
ใบ	2.08 ^{ab} ± 0.55	2.49 ^{aA} ± 0.16	1.64 ^{aA} ± 0.60
เปลือก	2.39 ^{aAB} ± 0.89	1.51 ^{ab} ± 0.52	1.92 ^{aA} ± 0.38
เนื้อ	4.31 ^{aA} ± 0.73	2.69 ^{aA} ± 0.41	2.47 ^{aA} ± 0.18
เมล็ด	1.86 ^{ab} ± 0.57	0.97 ^{ab} ± 0.06	1.61 ^{aA} ± 0.29

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวนอน และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P ≤ 0.05)

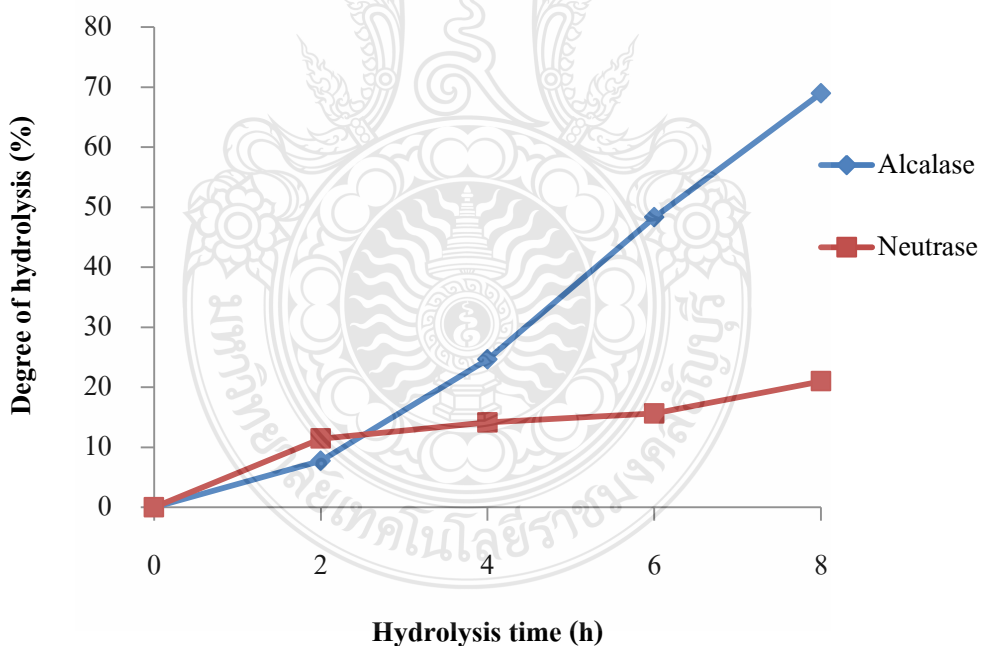
ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจับโลหะ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน การใช้น้ำ ในการสกัด สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการจับโลหะ สูงที่สุด รองลงมาคือ การใช้เอทานอลเข้มข้น 95% และเอทานอลเข้มข้น 50% ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบที่ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากเนื้อ และเปลือกมะรุมมีความสามารถในการจับโลหะสูงสุด รองลงมา ใบ และเมล็ดมะรุม ตามลำดับ โดยการทดลองพบว่า สารสกัดจากเนื้อมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ มีความสามารถในการจับโลหะ สูงสุดคิดเป็น 4.31 µg EDTA eq./g รองลงมาคือ สารสกัดจากเนื้อมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 50% คิดเป็น 2.69 µg EDTA eq./g

4.2 ศึกษาชนิดของเอนไซม์ในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ทางการค้า การวิเคราะห์ค่าระดับการย่อยสลาย และศึกษาการวิเคราะห์โปรตีนจากใบมะรุม

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆของมะรุม (ใบ เปลือก เนื้อ เมล็ด) พบว่าในใบมะรุมมีปริมาณโปรตีนสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 30.56 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mutilangi et al. (1996) ที่ว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทควรมีโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30 โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงเลือกใบมะรุมที่เป็นแหล่งของโปรตีน มาศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท [97]

4.2.1 การศึกษาระดับการย่อยสลาย

จากการศึกษาระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากใบมะรุมด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน คือ 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.1 พบว่าเมื่อระดับย่อยของตัวอย่างโปรตีนจากใบมะรุมด้วยเอนไซม์นิวเทรส และเอนไซม์อัลคาเลสที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้น ค่าระดับการย่อยสลายก็จะเพิ่มขึ้น ระดับการย่อยสลายของเอนไซม์นิวเทรส และเอนไซม์อัลคาเลส เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2-6 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลาย และเมื่อตัวอย่างถูกย่อยต่อจนถึงชั่วโมงที่ 8 พบว่าระดับการย่อยสลายของเอนไซม์นิวเทรส และเอนไซม์อัลคาเลส มีค่าการย่อยสลายเพิ่มขึ้น



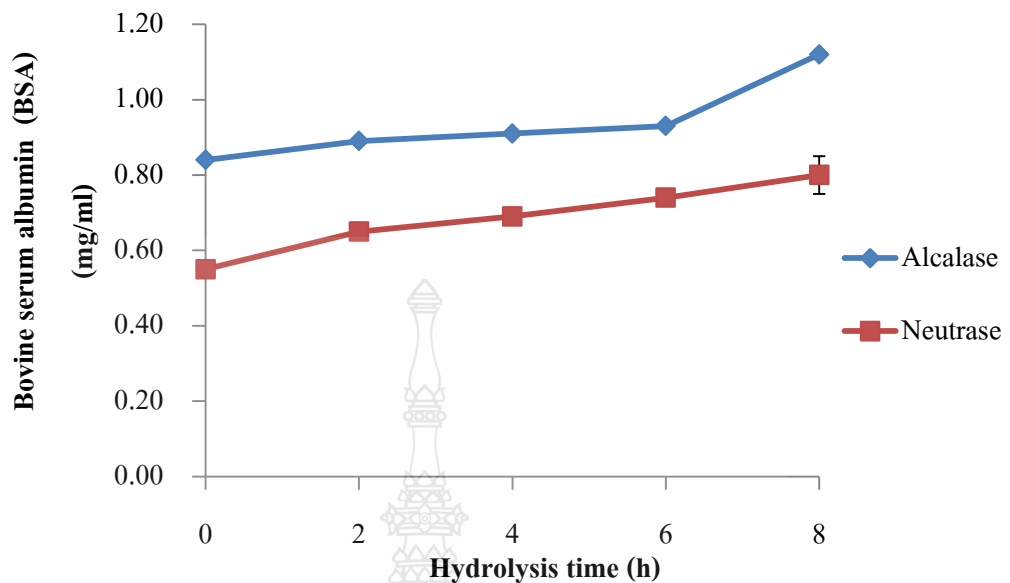
ภาพที่ 4.1 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากใบมะรุมด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายของแต่ละเอนไซม์พบว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงสุด ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu et al. (2006) ที่พบว่าการย่อยสลายโปรตีนจากจมูกข้าวสาลีด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 60 นาทีแรกและมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 25 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 360 นาที [55] และสอดคล้องกับงานวิจัยของลีนา (2555) ที่พบว่าการย่อยสลายโปรตีนถั่วหรั่งด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ [98] จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดโปรตีนเอส (Endoproteinase) ที่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง (Phenylalanine, Tryptophan, Tyrosine) กรดอะมิโนที่เป็นกรด (Glutamic acid) กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (Methionine) กรดอะมิโนที่เป็นโซ่ตรง (Leucine, alanine) กรดอะมิโนที่มีหมู่ -OH (Serine) และกรดอะมิโนที่เป็นเบส (Lysine) ในขณะที่เอนไซม์นิวเทรสเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะอยู่ในโครงสร้าง (Metallo endo proteinase) มีหมู่อะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic amino acids) ได้แก่ โกลซีน อะลานีน ลิวซีน โพรลีน วาลีน และไอโซลิวซีน ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีบทบาทในการทำปฏิกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน และเพิ่มความยืดหยุ่นของโปรตีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถตัดพันธะเพปไทด์บนสายโปรตีนหลายตำแหน่ง [42] ชนิดของเอนไซม์ สารตั้งต้น และระยะเวลาในการย่อยสลายมีผลต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท [99]

4.2.2 ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford อาศัยหลักการที่ว่าสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีนแล้ว ทำให้เกิดการเปลี่ยนความยาวคลื่น (Wavelength) ซึ่งสารเชิงซ้อนสีแดงจะวัดค่าดูดกลืนของแสงที่มีความยาวช่วงคลื่น 465 nm ส่วนสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินจะวัดค่าดูดกลืนของแสงที่มีความยาวช่วงคลื่น 595 nm ซึ่ง Bradford เป็นสารประกอบของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งเตรียมในสารละลายกรด เช่น Phosphoric acid หรือ Perchloric acid ซึ่งวิธีแบรดฟอร์ดเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว จะมีความไวต่อการทดสอบสูงโดยสามารถตรวจสอบโปรตีน 5-100 μg [100]

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยนานขึ้น (ภาพที่ 4.2) โดยที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง แสดงประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนสูงสุด ($P \leq 0.05$) ซึ่งจากผลการทดลองของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโหมรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณโปรตีนสูงสุด โดยคิดเป็น 1.12 mg/ml ในขณะที่การย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโหมรุมด้วยเอนไซม์นิวเทรส ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยคิดเป็น 0.80 mg/ml

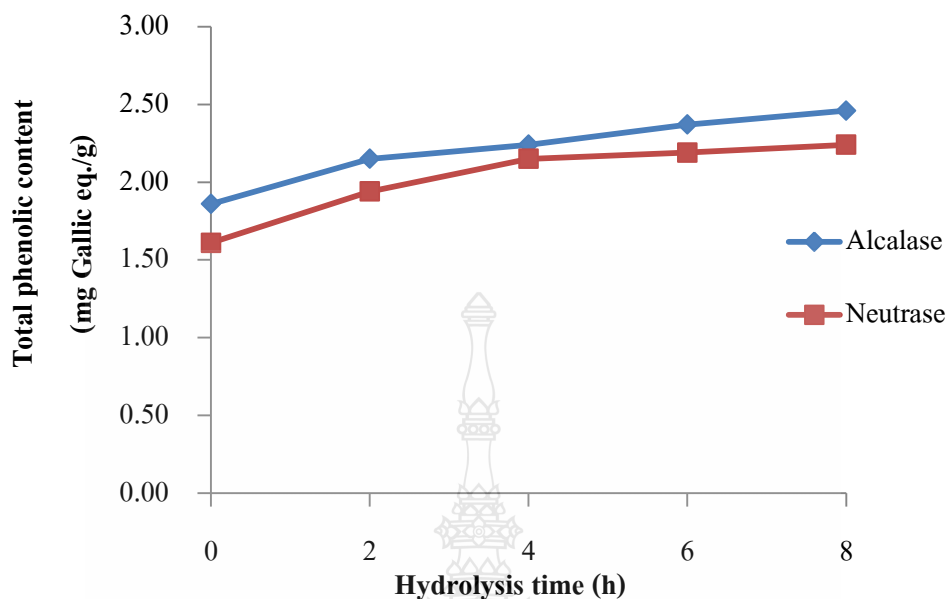


ภาพที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสและอัลคาเลส

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่พบในพืชทั่วไป [101] สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน เป็นต้น โดยสารต้านออกซิเดชันจะทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่ออนุมูลอิสระที่สำคัญคือ อนุมูลเปอร์ออกซี [102] โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆ ดังภาพที่ 4.3

พบว่าจากผลการทดลอง เมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมเพิ่มขึ้น ทำให้ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น โดยที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงแสดง ในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด ($P \leq 0.05$) ซึ่งจากผลการทดลองของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด โดยคิดเป็น 2.46 mg Gallic eq./g ในขณะที่การย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่ำที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยคิดเป็น 2.24 mg Gallic eq./g

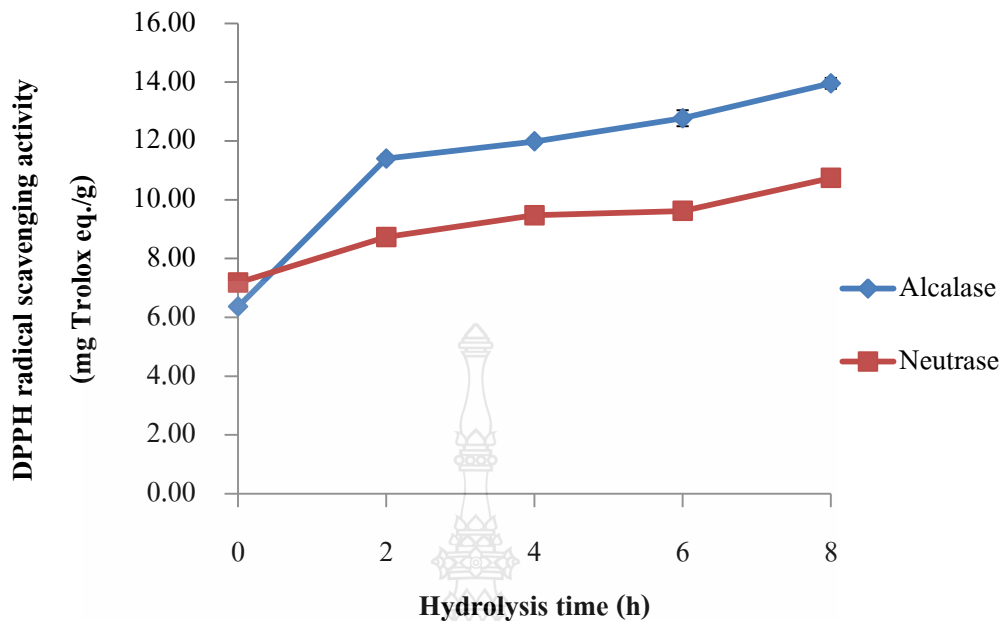


ภาพที่ 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

4.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุุม

4.2.4.1 วิธี DPPH radical scavenging activity

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารตัวอย่างในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ ซึ่งเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลสที่ระยะเวลาต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.4



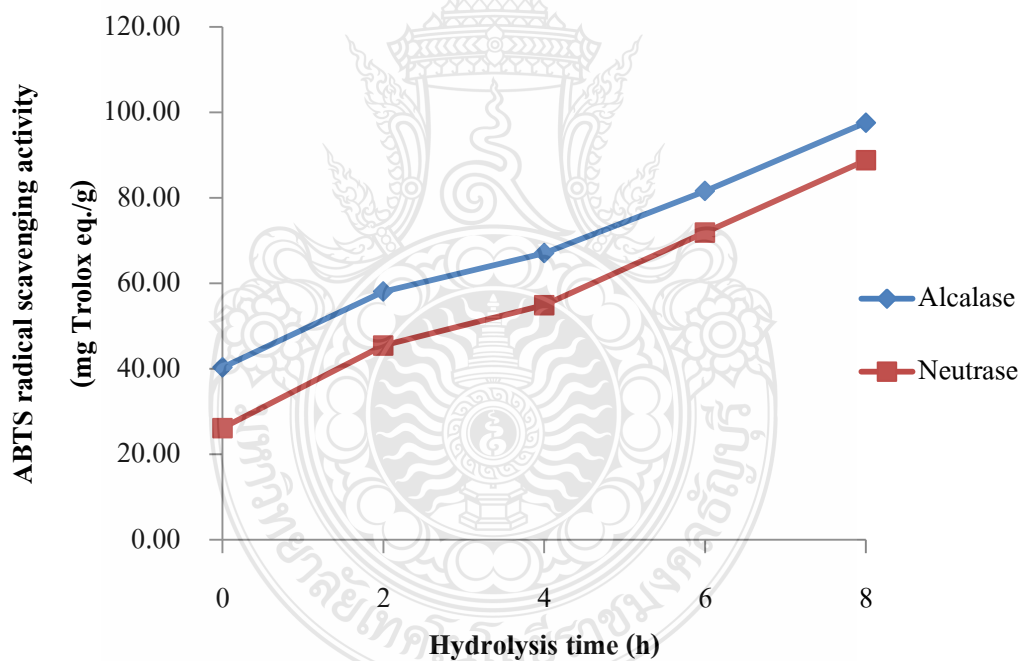
ภาพที่ 4.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระDPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบมะรุุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ

การย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบมะรุุมเพิ่มขึ้นจะทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงขึ้น โดยเพปไทด์ที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกันแสดงว่าระดับการย่อยสลายเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตเพปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 13.96 mg Trolox eq./g ในขณะที่การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ นิวเทรสทำให้ได้เพปไทด์ที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 10.74 mg Trolox eq./g ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอรุณลักษณ์ และคณะ (2561) พบว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลาราย ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 49.93% ในขณะที่การย่อยคอลลาเจนด้วยเอนไซม์ทริปซินทำให้ได้เพปไทด์ที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 28.96% [103] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงกว่าเอนไซม์อื่น ๆ จึงทำให้ได้เพปไทด์ที่สามารถให้ห่ออะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระได้มากกว่า ส่งผลให้เพปไทด์เหล่านี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระ และเปลี่ยนให้เป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ [104] นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดอะมิโนภายในเพปไทด์ซึ่งกรดอะมิโนภายในเพปไทด์ที่แสดงบทบาทสำคัญ ในการยับยั้งอนุมูล

อิสระคือกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก (Tyrosine, Histidine, Tryptophan และ Phenylalanine) กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Valine, Leucine และ Alanine) และกรดอะมิโน methionine [105], [106] ซึ่งในการต้านอนุมูลอิสระ เพปไทด์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้งแบบปฐมภูมิ และแบบทุติยภูมิโดยการดักจับอนุมูลอิสระ (Scavenging free radicals) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen) และจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Chelating metals) [107]

4.2.4.2 วิธี ABTS radical scavenging activity

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบมะรุมน (ภาพที่ 4.5) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบมะรุมนมีฤทธิ์ในการยับยั้ง $ABTS^+$ มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยนานขึ้น จากผลการทดลองทดลองการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบมะรุมนโดยมีการย่อยด้วย เอนไซม์นิวเทรส และเอนไซม์อัลคาเลส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด

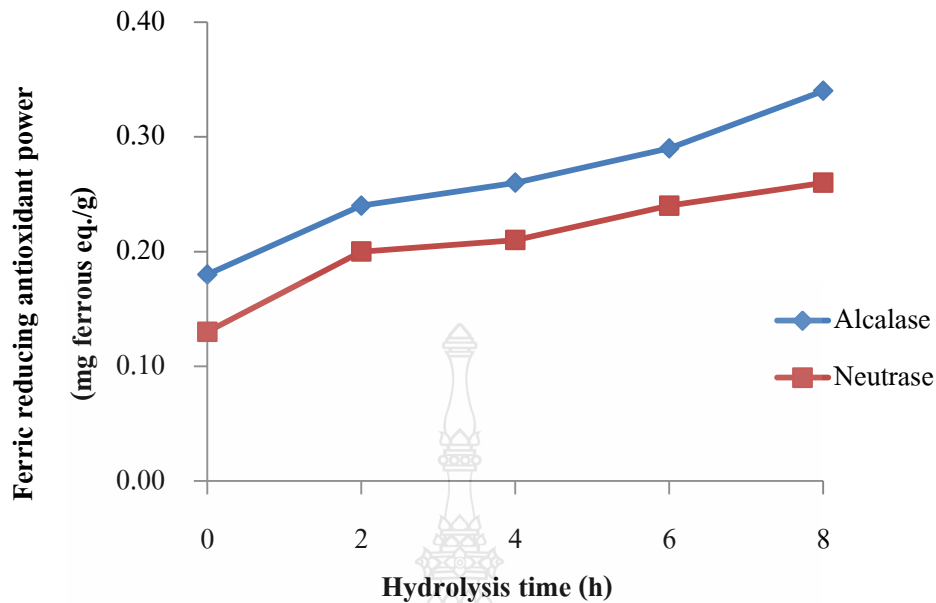


ภาพที่ 4.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบมะรุมนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกันแสดงว่าระดับการย่อยสลายเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตเพปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 97.60 mg Trolox eq./g ในขณะที่การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์นิวเทรสทำให้ได้เพปไทด์ที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 88.80 mg Trolox eq./g ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสุภาวดี (2550) ที่ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเซท พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายและความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซทเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.1 เป็นร้อยละ 0.5 และพบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยทั่วไปการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นการทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลงโปรตีนจึงแสดงลักษณะของความเป็นขี้มากขึ้น [23] นอกจากนี้มีรายงานของ Nalinanon et al. (2011) ที่ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดงโม่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินที่ได้จากปลาหูฉลาม พบว่าที่ระดับการย่อยสลयर้อยละ 20 โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดงโม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุสุดเช่นเดียวกัน [108]

4.2.4.3 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ผลการทดลองของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุ่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก ดังภาพที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe^{3+} กับ TPTZ (Ferric tripyridyltriazine) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนจะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็กตรอนทำให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ (Ferrous tripyridyltriazine)

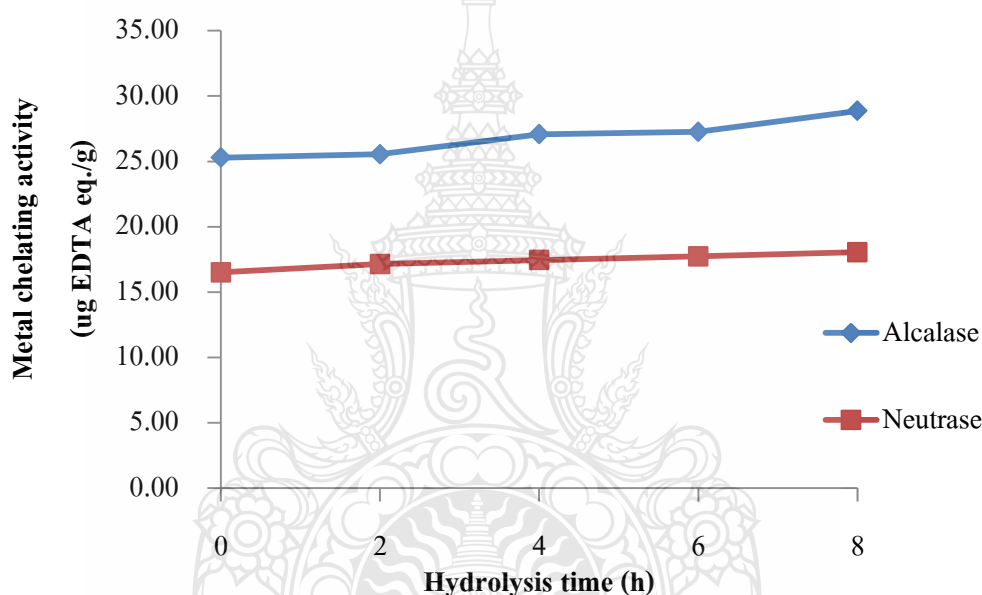


ภาพที่ 4.6 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบมะรุ่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ซึ่งผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบมะรุ่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์นิวเทรส มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกได้สูง ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะเอนไซม์จะตัดพันธะเปปไทด์ภายในโปรตีนทำให้ได้เปปไทด์ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้มากกว่าจึงทำให้ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกสูง นอกจากนี้ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบมะรุ่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และมีระยะเวลาการย่อย 8 ชั่วโมงแสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสอดคล้องกับงานวิจัยของอรุณลักษณ์ และคณะ(2561) พบว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากราย ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และมีระยะเวลาการย่อย 8 ชั่วโมงแสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระFRAPได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) [103] นอกจากนี้งานวิจัยของ Zambrowicz et al. (2012) รายงานว่าโปรตีนไข่แดงที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแสดงระดับการย่อยสลายดีที่สุด ขณะที่เปปไทด์จากโปรตีนไข่แดงที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจะมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของเอนไซม์ทั้งสามชนิดพบว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$) รองลงมาคือ เอนไซม์เปปซิน และทริปซิน ตามลำดับ [109]

4.2.4.4 วิธีวัดความสามารถในการแย่งจับ Fe^{2+} (Metal chelating activity assay)

วิธีนี้เป็นการทดสอบความสามารถจับไอออนของโลหะ (Metal chelating activity) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุม ทำการทดสอบจากปฏิกิริยาทางเคมีของสาร Ferrozine ที่เติมลงไปจะไปจับ Fe^{2+} แล้วอยู่ในรูป Ferrozine Fe^{2+} complex ซึ่งทำให้ได้ให้สีแดง เมื่อโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุมมีความสามารถในการจับ Fe^{2+} ทำให้สีแดงของ Ferrozine Fe^{2+} complex ลดลงโดยสังเกตจากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร จากการทดสอบพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถจับไอออนของโลหะเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี Metal chelating activity assay

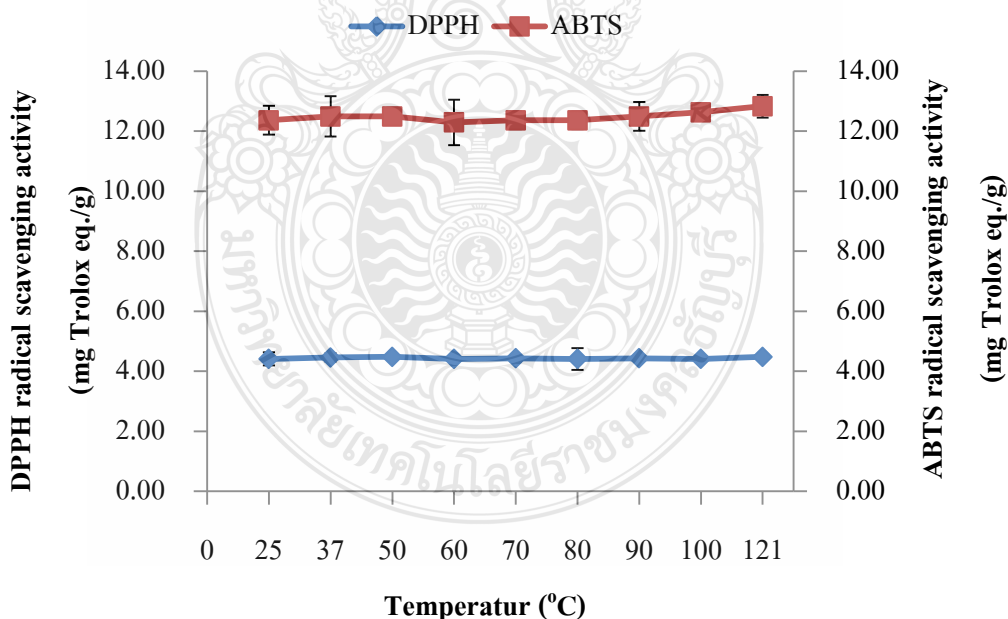
ผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส และอัลคาเลส พบว่า ความสามารถในการจับไอออนโลหะ จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีค่าความสามารถในการจับไอออนโลหะสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถจับไอออนโลหะได้ 28.87 μg EDTA eq./g ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุมที่ย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสได้พบไทด์ที่แสดงความสามารถในการจับไอออนโลหะต่ำที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยสามารถจับไอออนโลหะได้ 18.05 μg EDTA eq./g ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jamdar et al. (2010) ที่พบว่าโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซทที่ผ่าน

การย่อยโดยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการจับโลหะไอออนสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายโปรตีนถั่วลิสงเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 20, 30 และ 40 ตามลำดับ [110] ดังนั้นความสามารถในการจับโลหะของโปรตีนขึ้นอยู่กับโครงสร้าง และความยาวของสายเพปไทด์ซึ่งเพปไทด์หรือกรดอะมิโนนั้นจะแสดงสมบัติการจับโลหะ (Chelating agent) [77] จึงกล่าวได้ว่าเพปไทด์ในโปรตีนจากไบโมะรุมไฮโดรไลเซทสามารถทำหน้าที่เป็นสารคีเลตหรือสารอินทรีย์ที่สามารถจับอนุมูลอิสระหรือทำหน้าที่เป็น Prooxidants นำไปสู่การลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งการจับกับธาตุที่มีประจุบวก เช่น เหล็ก สังกะสี หรือทองแดง ในระบบของอาหารจะช่วยลดอัตราการเกิด Autoxidation และชะลอการเกิดสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่จะส่งผลต่อ กลิ่น รส ในอาหาร [111]

4.3 การศึกษาความคงตัวของอนุมูล และ pH

ศึกษาความคงตัวของอนุมูล และ pH โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ซึ่งการศึกษาความคงตัวนี้กำหนดปัจจัย 2 ปัจจัย คือ กำหนดอุณหภูมิ 25, 37, 50, 60, 70, 80, 90, 100 และ 121 องศาเซลเซียส และ pH กำหนดให้ทดสอบที่ 4, 7 และ 10 จากนั้นนำมาวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

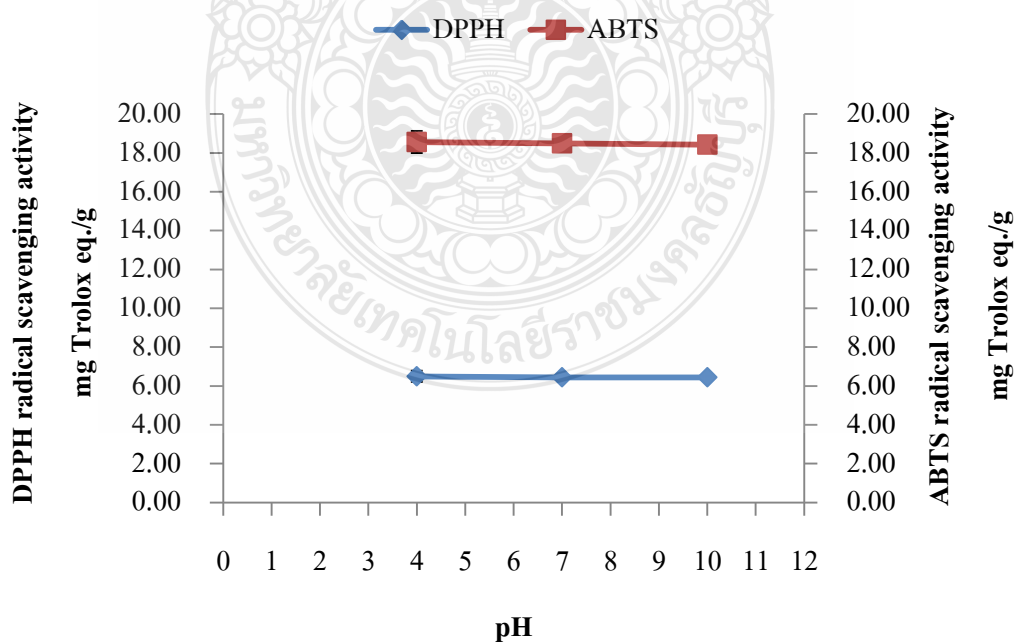
4.3.1 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุมด้วยเอนไซม์อัลคาเลส แสดงดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากไบโมะรุมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสด้วยวิธี DPPH และ ABTS

จากการทดลองผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสให้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จะมีค่าสูงกว่า DPPH โดยที่ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง 12.29-12.83 mg Trolox eq./g และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง 4.41-4.48 mg Trolox eq./g ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นไม่ได้ส่งต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุม เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lapsongphon et al. (2013) จากการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเขียวพบว่า เพปไทด์ F37 และ F42 มีความเสถียรภาพต่อความร้อนสูง โดยเมื่อนำมาผ่านกระบวนการทางความร้อน พบว่าไม่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเพราะเพปไทด์ของถั่วเขียวมีขนาดค่อนข้างเล็ก (677-1380 Da) ทำให้ไม่เกิดการรวมตัวกันหลังจากให้ความร้อน และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [112] ซึ่งในทางกลับกันงานวิจัยของ Tong et al. (2000) พบว่าเวย์โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลรวมสูงจะสูญเสียความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหลังจากให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที [113] นอกจากนี้งานวิจัยของ Ningappa et al. (2008) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบแกลงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง หลังจากให้ความร้อนที่ 65 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที [114]

4.3.2 ผลของ pH ต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมด้วยเอนไซม์อัลคาเลส แสดงดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 ผลของ pH ต่อความคงตัวของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุ่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส วิเคราะห์ด้วย วิธี DPPH และ ABTS

จากการทดลองผลของ pH ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุ่ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุ่ที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสให้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จะมีค่าสูงกว่า DPPH โดยที่ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วง 18.43-18.56 mg Trolox eq./g และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง 6.44-6.49 mg Trolox eq./g ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า pH ไม่ได้ส่งต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุ่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lapsongphon et al. (2013) พบว่าเพปไทด์ F37 และ F49 สามารถนำไปใช้ใน ช่วง pH ที่กว้างได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้งานวิจัยของ Liu et al. (2010) พบว่าโปรตีนพลาสมาไฮโดรไลเซทที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส สามารถทนต่อ pH ในช่วง 3.0-8.0 และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนพลาสมาที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนสายยาวกับโปรตีนสายสั้น พบว่าเพปไทด์ที่สายสั้นจะได้รับผลกระทบน้อยเมื่อเกิดความเปลี่ยนแปลงของ pH ทำให้เกิดความเสถียรสูงในช่วง pH กว้าง และนอกจากนี้ความสามารถในการละลายของเพปไทด์ขนาดเล็กจะมีความสามารถในการละลายในช่วง pH ที่กว้างได้และอาจจะส่งผลดีต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [115]



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากมะรุมต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆของมะรุม (ใบ เปลือก เนื้อ เมล็ด) พบว่า ใบมะรุมจะมีค่าปริมาณโปรตีนสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 30.56 ซึ่งสูงกว่า เมล็ดเปลือก เนื้อมะรุม และตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุม ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอลเข้มข้น 50 และ 95% พบว่า เอทานอลเข้มข้น 50% สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงที่สุดในทุกตัวอย่าง ซึ่งสกัดได้สูงกว่าการใช้น้ำ และ เอทานอลเข้มข้น 95%

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเพอริค พบว่า เอทานอลเข้มข้น 50% สามารถสกัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเพอริคได้สูงที่สุดที่ตัวอย่างใบมะรุม และความสามารถในการจับโลหะ พบว่า เอทานอลเข้มข้น 95% สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการจับโลหะได้สูงสุดที่ตัวอย่างเนื้อมะรุม

จากการศึกษาชนิดของเอนไซม์ในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ทางการค้า การวิเคราะห์ค่าระดับการย่อยสลาย และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุม พบว่าระดับการย่อยสลาย และความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ใช้เอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลาย และความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด เมื่อเปรียบกับเอนไซม์นิวเทรส

ศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากใบมะรุมที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีความคงตัวต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ในช่วงอุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียส และ pH 4-10

บรรณานุกรม

- [1] Mani, S., Jaya, S., and Vadivambal, R. (2007). Optimization of solvent extraction of Moringa (*Moringa oleifera*) seed kernel oil using response surface methodology. Food and Bioprocess technology. 85: 328-335.
- [2] Nandave, M., Ojha, S. K., Joshi, S., Kumari, S., and Arya, D. S. (2009). *Moringa oleifera* leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: Evidence for an antioxidant, antiperoxidative and cardioprotective intervention. Journal of Medicinal Food. 12(1), 47-55.
- [3] Muhammad, A. A., Karthivashan, G., and Arulselvan, P. (2015). In vitro antioxidant properties of bioactive fraction of *Moringa oleifera*. Journal Natural Products Biological Research. 51-56.
- [4] Makkar, H. P. S. and Becker, K. (1996). Nutritional value and anti-nutritional component of whole and ethanol extracted *M. oleifera* leaves. Animal Feed Science and Technology. 63: 211-228.
- [5] Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., and Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. African Journal of Biotechnology. 10: 12925-12933.
- [6] Jongrungruangchok, S., Bunrathep, S. and Songsak, T. (2010). Nutrients and minerals content of eleven different samples of *Moringa oleifera* cultivated in Thailand. Journal of Health Research. 24(3): 123-127
- [7] Chuang, P. H., Lee, C. W., Chou, J. Y., Murugan, M., Shieh, B. J. and Chen, H. M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. Bioresource Technology. 232-236.
- [8] Ferreira, P. M. P., Farias, D. F., Oliveira, J. T. D. A., and Carvalho, A.D.F.U. (2008). *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. Annual Review of Nutrition. 21: 431-437.
- [9] Kasolo, J. N., Bimenya, G. S., Ojok, L., Ochieng, J., and Ogwal-Okeng, J. W. (2010). Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. Journal of Medicinal Plants Research. 753-757.
- [10] อธิกา จารุโชติกุล, ปวีตรา พูลบุตร, จริญญาพร เพรศิแก้ว, ปวีณสุตา สามสี, รุ่งนภา ปาพรม และ ศิวากรณ์ แดนรักษ์. (2555). ฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว. มหาสารคาม : คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- [11] Pamok S, Saephet S, Viniketkumnun U, and Saenphet K. (2012). Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderan themum palatiferum* (Nees)

- Radlk extracts on the colon cancer cells Journal of Medicinal Plants Research. 6 (1). 139-145.
- [12] Tragulpakseerojn, J., Pamonsilapatham, P., Wetwitayaklung, P., Nuntharatanapong, N., and Apirakaramwong, A. (2016). The effect of *Moringa oleifera* ethanolic leaf extract and its 2 major active components on colon cancer cell viability. (6th ed). The International Conference on Natural Products for Health and Beauty.
- [13] Yaméogo, C. W., Bengaly M. D., and Savadogo, A. (2011). Determination of chemical composition and nutritional values of *Moringa oleifera* leaves. Pakistan Journal of Nutrition, 264-268.
- [14] Compaoré, W. R., Nikiem, P .A., Bassole H .I .N., Savadogo, A., Mouecoucou J., Hounhouigan D.J. and Traore S.A. (2011). Chemical composition and antioxidative properties od seed of *Moringa oleifera* and pulps of *Parkia biglobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in burkina faso. Current Research Journal of Biological Sciences , 64-72.
- [15] Amabye, T .G. (2016). Chemical compositions and nutritional value of moringa oleifera available in the market mekelle. Journal of Food and Nutrition Sciences, 187-190.
- [16] AOAC. (2000). Official Method of Analysis of AOAC international. (17th ed). The Association of Official Analytical Chemists. Virginia.
- [17] สมปอง ธรรมศิริรักษ์. (2550). โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. จำนวน 187 หน้า
- [18] Riis, P. M. (1983). Dynamic biochemistry of animal production. Elsevier Science PublisherB.V. The Netherlands. 501 pp.
- [19] McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, C. A. Morgan, L. A. Sinclair, R. G.Wilkinson. (2011). Animal Nutrition (7th ed). Pearson, Harlow, England. 692 pp.
- [20] Biesalski H. K., Wellner U., Stofft E., Baessler K. H. (2005). Vitamin A deficiency and sensory function Acta Vitaminologica et Enzymologica, 7 (Suppl) 45-54.
- [21] Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins – Implication on structure and quality of meat products. Meat Science. 70: 493-508.
- [22] Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S. and Mare, I. (2007). Hydrolysis of rapseed protein isolates: kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. Process Biochemistry. 42: 1419-1428.
- [23] สุภาวดี ทรัพย์สิริไพบูลย์. (2550). ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการตัดแปรด้วยวิธีทางเอนไซม์และวิธีทางเคมี วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

- [24] ฉันทนันท์ ศรีพันธ์ลม, ฐิติพร ชูศรี และณัฐนิช ประทุมศรี. (2555). การศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใบกระถิน. วารสารวิชาการราชภัฏตะวันตก , 11-18.
- [25] Thongsook Tipawan. (2559). การสกัดโปรตีนและน้ำตาลจากร้าข้าวสาคัดน้ำมัน. นรศวรวิจัยครั้งที่ 12, 408-417.
- [26] Onasanya, A., Adewale, O. B., Obafemi, T. O., Ojo, A. A., Prebor, A. D., Abu, M. E., Omokhuale, F.M., Afolabi, A., Afolabi, B.A. and Falode, J.A. (2015). Comparison of Protein Yields of Four Protein Extraction Methods from Leaf and Seed of *Moringa oleifera*. International Journal of Applied Research and Technology. 98-109.
- [27] Krohn, R.I. (2005). The colorimetric detection and quantitation of total protein. In Handbook of Food Analytical Chemistry. (Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwatz, S. J., Schoemaker, C. E., Smith, D. and Sporn, P. eds.). Wiley and Sons, Inc., Hoboken.
- [28] ฉันทพร จันทน์แสนโรจน์. (2550). การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinina* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [29] Vaštag, Z., Popović, L., Popović, S., Krimer, V. and Peričin, D. (2010). Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. Food and Bioproducts Processing. 88: 277 – 282.
- [30] Samaranayaka, A. G. P. and E. C. Y. Li-Chan. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. Journal of Functional Food. 3: 229-254.
- [31] Je, J. Y., P. J. Park, and S. K. Kim. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Research International. 38: 45-50.
- [32] ณัฐวุฒิ ส่งแสง. (2550). การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสทะเลจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวโดยเอนไซม์โปรติเอส วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- [33] Kristinsson, G. H. and Rasco, A. B. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. Process Biochemistry. 131–139.
- [34] ฉันทพร จันทน์แสนโรจน์. (2550). การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหอยเป่าชื่อ *Haliotis asinina* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- [35] Guerard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., and Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna *Thunnus albacores* wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 1051-1059.
- [36] Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F., and Kim, S. K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 78: 651-656.
- [37] Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S., and Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 1984-1989.
- [38] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K. D., and Shahidi, F. (2008). Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science and Technology*. 43: 1019-1026.
- [39] Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F. and Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: Peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6300-6308.
- [40] Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., and Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*. 107: 1485-1493.
- [41] Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B. A., and Voragen, A.G. J. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and-stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2938-2946.
- [42] Zhao, X. and Hou, Y. (2009). Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. *African Journal of Biotechnology*. 8: 3314-3319.
- [43] Zhang, J. H., Zhang, H., Wang, L., Guo, X. N., Wang, X. G., and Yao, H. Y. (2010). Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry*. 119: 226-234.
- [44] Silvestre, M .P .C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 60: 263-271.

- [45] Moore, S. and Stein, W.H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. *Biological Chemistry*. 176: 367-388.
- [46] Churuch, F. C., Porter, D. H., Catignani, G. L. and Swaisgood, H. E. (1985). An ophthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry*. 146: 343-348.
- [47] นิธิยา รัตนานนท์. 2551. เคมีอาหาร พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์
- [48] Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Food Science and Nutrition*. 13: 155-203.
- [49] พรชนัน เทียวท้าว. (2548). การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโอคาราโดยกระบวนการทางเคมี วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- [50] Govindaraju, K. and Srinivas, H. (2004). Studies on the effect of enzymatic hydrolysis on functional and physicochemical properties of arachin. *LWT-Food Science and Technology*. 56: 183-191.
- [51] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shaidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Dearoides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*. 1317-1327.
- [52] Thiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. (2007). Compositions, Functional properties and Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*. 103: 1385-1394.
- [53] Damodaran, S. and Paraf, A. 1997. *Food Protein and Their Application*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- [54] Taha, F. S. and Ibrahim M. A. (2002). Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins. *Grasas y Aceites*. 53: 273-281.
- [55] Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*. 4: 1296-1302.
- [56] Yoshie-Stark, Y., Wada, Y. and Wasche, A. (2008). Chemical composition, functional properties and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry*. 107: 32-39.
- [57] Yoshie-Stark, Y. and Wasche, A. (2004). In vitro binding of bile acids by lupin protein isolate and their hydrolysates. *Food Chemistry*. 88: 179-184.

- [58] Li, G. H., Le, G. W., Liu, H. and Shi, Y. H. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International*. 11: 281–287.
- [59] Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. and Wu, Y. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 102: 1135–1143.
- [60] Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. and Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*. 106: 444 – 450.
- [61] Horiguchi, H. and Suzuki, Y. (2005). Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 69: 2445–2449.
- [62] Pena – Ramos, A.E. and Xiong, L.Y. (2003). Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Science*. 64: 259–263.
- [63] เยาวภา เจริญศิวกุล. 2549. กิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชันและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากกล้ามเนื้อปลาทุแวก (*Decapterus maruadsi*) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- [64] Chanput, W., Theerakulkait, C. and Nakai, S. (2009). Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *Journal of Cereal Science*. 49: 422-428.
- [65] ศกุนตลา พร้อมมูล, เอกสิทธิ์ จงเจริญรักษ์ และสุทธวิทย์ เบญจกุล. (2552). การศึกษากรรมกรรต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเครื่องในปลาทุพันธุ์โอแลบ (*Katsuwonuspelamis*). เรื่องเต็มการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35. 15-17 ตุลาคม. มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี
- [66] ศิริธร ศิริอมรพรรณ. (2557). สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียน สโตร์.
- [67] ไมตรี สุทธิจิตต์, รัตนา บรรณเจตพงศ์ชัย, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ศิริธร ศิริอมรพรรณ, ไชยวัฒน์ ไชยสุต, สุพัตรา ปรศุพัฒนา, อุไรวรรณ พานิช, ชลธิดา เทพหินลัพ และศุภชัย เจริญสิน. (2555). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. เชียงใหม่: สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย.
- [68] Siddhuraju, P. and Becker, K. (2003). Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.). Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2144-2155.

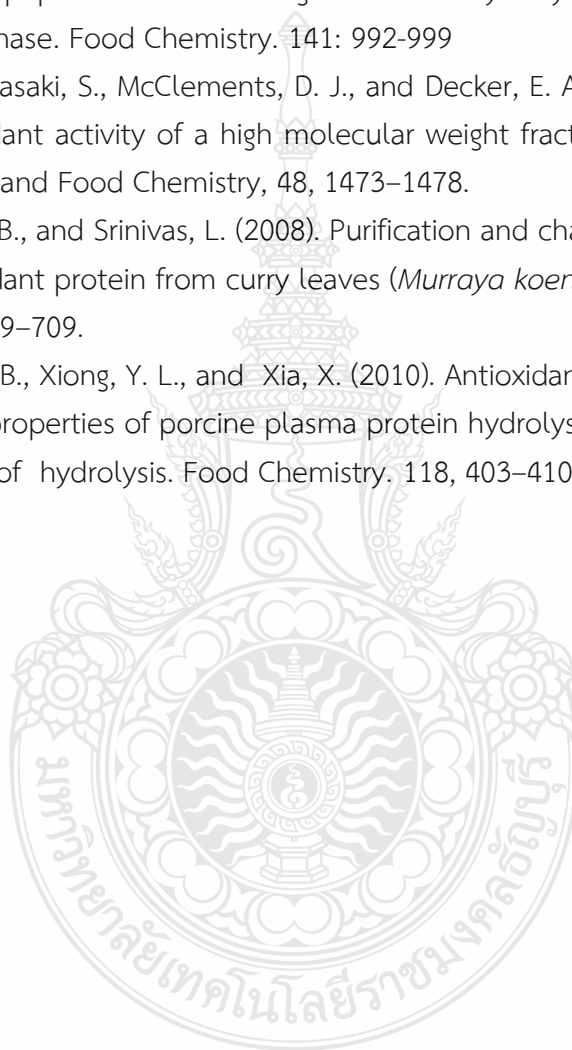
- [69] Naeem, S., Ali, M. and Mahmood, A. (2012). Optimization of extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 535-541.
- [70] Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. and Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*. 566-571.
- [71] Premi, M. and Sharma, H.K. (2013). Oil Extraction Optimization and Kinetics from *Moringa Oleifera* (PKM 1) Seeds. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*. 371-378.
- [72] Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*. 246-254.
- [73] Oboh, G., Ademiluyi, A.O., Ademosun, A.O., Olasehinde, T.A., Oyeleye, S.I., Boligon, A.A. and Athayde, M.L. (2015). Phenolic Extract from *Moringa oleifera* Leaves Inhibits Key Enzymes Linked to Erectile Dysfunction and Oxidative Stress in Rats' Penile Tissues. *Biochemistry Research International*. 1-8.
- [74] Ilyas, M., Arshad, M. U., Saeed, F. and Iqbal, M. (2015). Antioxidant potential and nutritional comparison of moringa leaf and seed powders and their tea infusions. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 226-233.
- [75] Fitriana, W. D., Ersam, T., Shimizu, K. and Fatmawati, S. (2016). Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Extracts. *Indonesia Journal of Chemistry*, 297-301.
- [76] Hamed, M.M., Abdalla, A.M., Gharee, M.A. and Saleh S.A. (2017). Chemical constituents, *In vitro* antioxidant activity, oral acute toxicity and LD₅₀ determination of *Moringa oleifera* leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 240-247.
- [77] Loizzo, M. R., Tundis, R., Chandrika, U. G., Abeysekera, A. M., Menichini, F., Frega, N. G. (2010). Antioxidant and antibacterial activities on foodborne pathogens of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) leaves extracts. *Journal Food Science*. 75, M291-M295
- [78] Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(1): 3954-3962.

- [79] Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolyzates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27: 1256-1262.
- [80] Benjakul, S., and Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 3423-3430.
- [81] Grimsley, G. R. and Pace, C. N. (2003). *Current Protocols in Protein Science*. By John Wiley and Sons, Inc, p.311-319.
- [82] Zhang Z S, Li D, Wang LJ, Ozkan N, Chen XD, Mao ZH, and Yang HZ. (2007). Optimisation of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*. 57:17-24.
- [83] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.
- [84] 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.
- [85] Decker, E. A., and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 674-677.
- [86] Price, M.L. 2000. The moringa tree. Available at: http://www.echonet.org/chenetwork.org/files_pdf. Accessed on 29 September, 2017.
- [87] Foidl, N., H. P. S. Makkar, and K. Becker. (2001). The Potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. Available at: <https://miracletrees.org>. Accessed on 26 September, 2017.
- [88] Richter, N., P. Siddhuraju, and K. Becker. (2003). Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture research*. 217: 599-611.
- [89] Spigno G, Tramelli L, Favari DDM. (2007). Effects of extraction time, temperatre and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food Engineering*. 81: 200-8.
- [90] Zhang WW, Duan XJ, Huang HL, Zhang Y and Wang BG. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions derived from *Symphyclocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology*. 97-108

- [91] เอนก หาลี, บุญยกฤต รัตนพันธ์. (2560). การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการระดับชาติ วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. ปีที่ 40 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2560. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร. กำแพงเพชร; หน้า 283-92.
- [92] Burits M, Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 14:323-8.
- [93] Sreelatha S, and Padma PR. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*; 64: 303-311.
- [94] Pelletta N, Serafini M, Colombi B, Rio DD, Salvatore S, Bianchi M, and Brighenti F. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods. Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *The Journal of Nutrition*; 133: 2812-2819.
- [95] Govardhan Singh RS, Negi PS, and Radha C. (2013). Phenolic composition antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. *Journal of Functional Foods*, 5: 1883-1891.
- [96] Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, Salicylate and 5-Amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 315(1): 161-169.
- [97] Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., and Kilara, A. (1996). Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science*. 61: 270-274.
- [98] ลีนา หง้าผา. (2555). องค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทสาขา วิทยาศาสตร์การอาหาร และโภชนาการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- [99] Ghanbari, R., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Ismail, A., and Saari, N. (2015). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory and anti-oxidant activities of sea cucumber (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 28870-28885.
- [100] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 12: 248-254.

- [101] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-955.
- [102] Packer, L., Rimbach, G., and Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 704-724.
- [103] อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์, กิรติ ตันเรื่อน, พิมพชนก พริกบุญจันทร์ และทิพย์วรินทร์ รีมลาดวน. (2561). ผลของคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลากรายที่มีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอนจิโอเทนซินวัน-คอนเวอร์ตติ้งและต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
- [104] Pazinato, C., Malta, L.G., Pastore, G.M., and Netto, F.M. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, 33, 485-493.
- [105] Chen, H. M., Muramatoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 49-53.
- [106] Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G. and Kim, S. K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 562-569.
- [107] Venskutonis, P. R. (2014). Natural antioxidants in food systems. In G. Bartosz. (Eds.), *Food oxidants and antioxidants: chemical, biological, and functional properties*. (pp. 235-301). New York: CRC Press.
- [108] Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura H. and Shahidi F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*. 124: 1354-1362.
- [109] Zambrowicz, A., Pokora, M., Eckert, E., Szoltysik, M., Dbrowska, A., Chrzanowska, J., and Trziszka, T. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of lecithin free egg yolk protein preparation hydrolysates obtained with digestive enzymes. *Functional Foods in Health and Disease*, 2, 487-500.
- [110] Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., and Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant

- activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry. 121: 178-184.
- [111] Gordon, M. (2001). Antioxidants and food stability. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (Eds.), Antioxidant in Food: 7–21. New York, USA: CRC Press. 158-322.
- [112] Lapsongphon N., and Yongsawatdigul J. (2013). Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. Food Chemistry. 141: 992-999
- [113] Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., and Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 1473–1478.
- [114] Ningappa, M. B., and Srinivas, L. (2008). Purification and characterization of 35 kDa antioxidant protein from curry leaves (*Murraya koenigii* L.). Toxicology in Vitro, 22, 699–709.
- [115] Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., and Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. Food Chemistry. 118, 403–410.

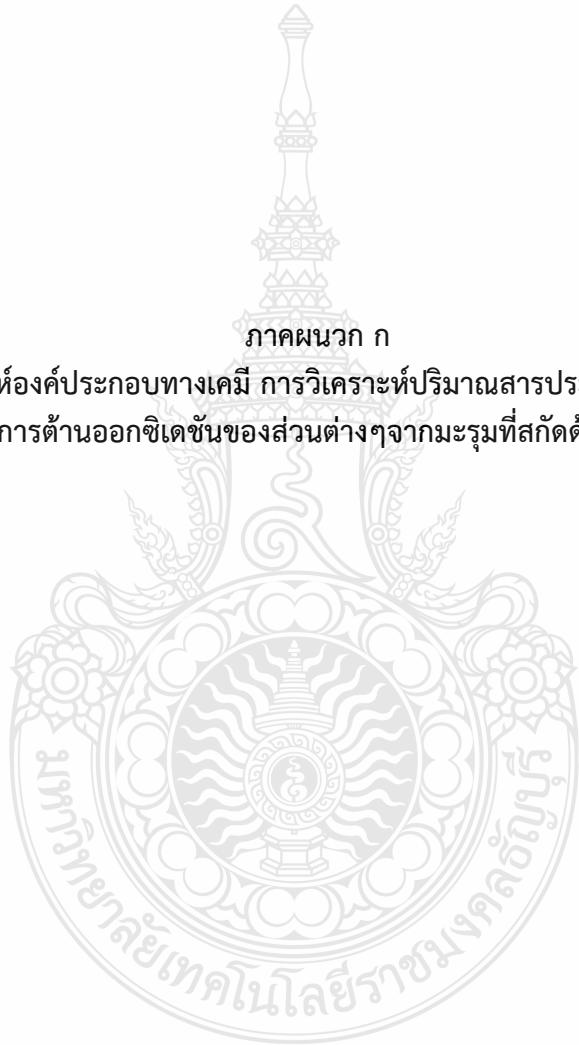


ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และ
ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของส่วนต่างๆจากมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ



1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น [16]

- 1) อบถั่วยอลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- 2) ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม ใส่ลงในถั่วยอลูมิเนียมที่อบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
- 3) นำถั่วยอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 ถึง 107 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที นำเอามาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 4) นำไปชั่งน้ำหนักอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ซึ่งค่าที่ได้จะแตกต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดของถั่วยอลูมิเนียมและน้ำหนักตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน [16]

ขั้นตอนการย่อย

- 1) การชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัมใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
- 2) ใส่สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต และโพแทสเซียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม
- 3) เติมนครดซัลฟูริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร
- 4) วางหลอดย่อยในตัวอย่างย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ต่าง และเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย
- 5) เปิดสวิตช์เครื่องดักจับไอกรด และเตาย่อยแล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีจากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 400 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส
- 6) ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรท

- 1) จัดอุปกรณ์กลั่น แล้วเปิดสวิตช์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น
- 2) นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมนินดิเคเตอร์แล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรด
- 3) เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ทำปฏิกิริยาเกินพอ สังเกตให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขุ่น
- 4) กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 125 มิลลิลิตร
- 5) ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{โปรตีน (\%)} = \frac{(A - B) \times N \times 1.4007 \times F}{W}$$

เมื่อ A คือปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับแบงก์ (มิลลิลิตร)

N คือความเข้มข้นของกรด (N)

F คือ แฟคเตอร์ (5.85)

W คือน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน [16]

- 1) นำตัวอย่างที่หาความชื้นแล้ว ประมาณ 3 กรัม ใส่บนกระดาษกรองและห่อมิดชิด
- 2) นำตัวอย่างที่ห่ออยู่ในกระดาษกรอง ใส่ลงในทิมเบล
- 3) นำทิมเบลใส่ใน Extraction Unit of Soxhlet ซึ่งเชื่อมต่อกับ 1046 Service Unit โดยใช้เครื่อง adapter แล้วนำ Extraction cup ไปอบแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- 4) เต็มปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดกลั่นที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 150 มิลลิลิตร ประกอบเครื่อง Soxhlet เข้าด้วยกัน
- 5) ให้ความร้อนทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างนานประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นจาก condenser มีอัตรา 150 หยดต่อนาที
- 6) กลั่นเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมัน นำขวดกลั่นและไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก
- 7) อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที และชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมันจากสูตร

$$\text{ไขมัน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณใยอาหารโดยใช้วิธีการสกัดด้วยกรด-ด่าง [16]

- 1) นำกระดาษกรองอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงแล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก
- 2) ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันออก และนำมาใส่ในบีกเกอร์สำหรับวิเคราะห์ใยอาหาร
- 3) เติมกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
- 4) วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่น เปิดสวิตซ์ไฟฟ้าต้มให้เดือดนาน 30 นาที

5) กรองตัวอย่างขณะร้อนผ่านกระดาษกรองล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด

6) ถ่ายกากที่ได้ในปิกเกอร์ใบเดิมเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

7) วางปิกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่น เปิดสวิตซ์ไฟฟ้า ต้มให้เดือดนาน 30 นาที

8) กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิมล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นต่าง

9) ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

10) นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบและอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น

11) ชั่งน้ำหนักซ้ำจนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณหาปริมาณใยอาหารตามสูตรดังนี้

$$\text{ใยอาหาร (\%)} = \frac{(M2 - M1) \times 100}{S}$$

เมื่อ M1 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

M2 คือผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

S คือน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า [16]

1) อบ Crucible ที่อุณหภูมิประมาณ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2) นำตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ชั่งใส่ Crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควัน

3) นำไปเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว

4) นำออกมาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เถ้าจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

6. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต [16]

โดยวิธีการคำนวณจากสูตรเมื่อทราบค่า % ความชื้น% โปรตีน% ไขมัน% เถ้า และ% เส้นใย นำค่าดังกล่าวนี้มาคำนวณตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\% \text{ ความชื้น} + \% \text{ โปรตีน} + \% \text{ ไขมัน} + \% \text{ เถ้า} + \% \text{ เส้นใย})$$

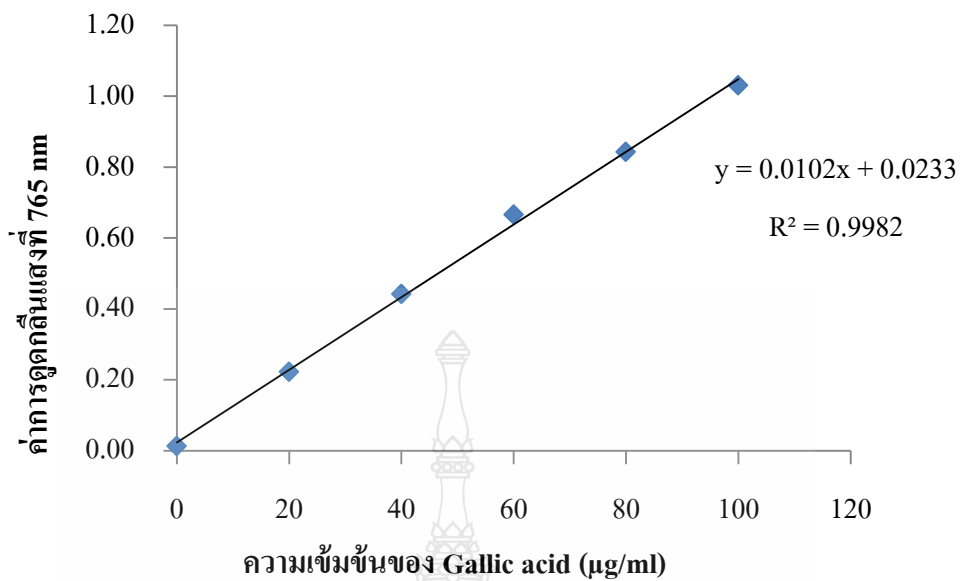
1. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงวิธีมาจาก Kähkönen และคณะ (1999) เตรียมสารละลาย folin-ciocalteu reagent เข้มข้น 0.2 M โดยปิเปต Folin-Ciocalteu reagent 2 โมลลาร์ 10 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 75 g/l โดยชั่ง โซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เข้มข้น 100 µg/ml โดยชั่ง 0.0100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-100 µg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่าง จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติม folin-ciocalteu reagent 2.5 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2.0 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร [78]

1.1 ค่าการดูดกลืนแสง ของ Gallic acid ที่เป็นสารมาตรฐาน ทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังตารางที่ ก.1 และภาพที่ ก.1

ตารางที่ ก.1 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
Gallic acid	0.0	0.015	0.010	0.013
	20.0	0.209	0.235	0.222
	40.0	0.431	0.452	0.442
	60.0	0.666	0.665	0.666
	80.0	0.842	0.843	0.843
	100.0	1.024	1.036	1.030



ภาพที่ ก.1 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Gallic acid ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

1.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุม เพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังตารางที่ ก.2

ตารางที่ ก.2 ผลค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
น้ำ	ใบ 1	0.440	0.454
	ใบ 2	0.482	0.474
	เนื้อ 1	0.267	0.259
	เนื้อ 2	0.273	0.278
	เมล็ด 1	0.340	0.326
	เมล็ด 2	0.337	0.346
	เปลือก 1	0.147	0.137
	เปลือก 2	0.147	0.149
	ใบ 1	0.337	0.346
	ใบ 2	0.348	0.342
	เนื้อ 1	0.154	0.151

50% เอทานอล	เนื้อ 2	0.168	0.185
	เมล็ด 1	0.114	0.124
	เมล็ด 2	0.126	0.116
	เปลือก 1	0.100	0.107
	เปลือก 2	0.119	0.115
95 % เอทานอล	ใบ 1	0.538	0.542
	ใบ 2	0.547	0.556
	เนื้อ 1	0.105	0.178
	เนื้อ 2	0.103	0.145
	เมล็ด 1	0.120	0.125
	เมล็ด 2	0.160	0.168
	เปลือก 1	0.094	0.074
	เปลือก 2	0.069	0.096

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ในการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบ 2.5014 g ใน Ethanol 100 ml และทำการเจือจาง 5 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Gallic acid พบว่าเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสง ของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.1 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Gallic acid เท่ากับ 25.20 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 2520.49 µg/ml

จากสมการ พบว่าสารสกัด 1 ml มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 252,049 µg แสดงว่าสารสกัด 100 ml จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 2.5205 mg

ถ้าตัวอย่างหนัก 2.5014 g มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 2.5205 mg ดังนั้นใบ 1 g จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ $\frac{2.5205\text{mg}}{2.5014\text{g}} \times 1,000 = 1,007.63$ µg

2. วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

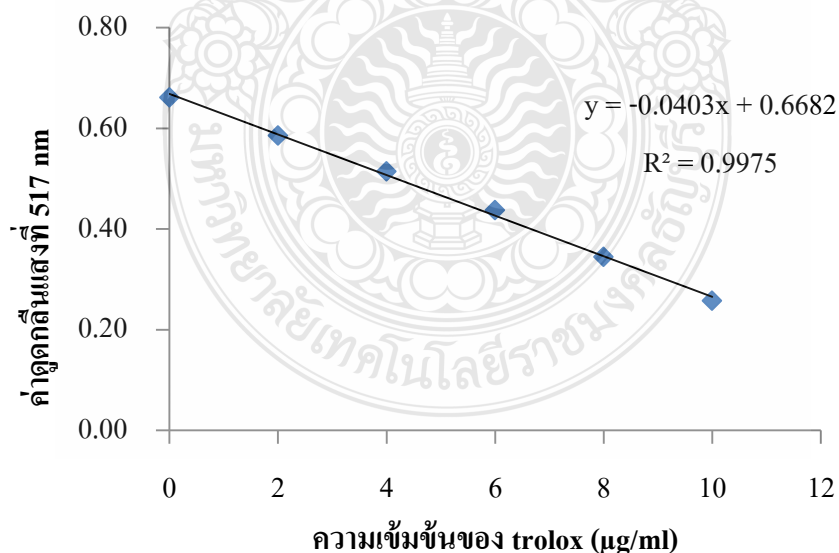
การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงวิธีการจาก Zhang et al. (2007) เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร DPPH 0.0147 กรัม ละลายด้วย Ethanol และปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox เข้มข้น 500 µg/ml โดยชั่งสาร 0.0504 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และเอทานอล (1:1) ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-10 µg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง จำนวน 1.0 มิลลิลิตร

เติม DPPH 1.0 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ในที่มีด นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของตัวอย่างในรูปความเข้มข้นของ Trolox (mg Trolox /g) [82]

2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตารางที่ ก.3 และภาพที่ ก.2

ตารางที่ ก.3 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (µg/ml)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย
Trolox	0	0.663	0.660	0.662
	2	0.584	0.587	0.586
	4	0.512	0.516	0.514
	6	0.436	0.439	0.438
	8	0.346	0.343	0.345
	10	0.256	0.258	0.257



ภาพที่ ก.2 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

2.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุ้มเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุ้มที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆดังตารางที่ ก.4

ตารางที่ ก.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากส่วนต่างๆของมะรุ้มที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
น้ำ	ใบ 1	0.445	0.457	
	ใบ 2	0.445	0.443	
	เนื้อ 1	0.487	0.475	
	เนื้อ 2	0.477	0.493	
	เมล็ด 1	0.610	0.593	
	เมล็ด 2	0.613	0.614	
	เปลือก 1	0.625	0.630	
	เปลือก 2	0.629	0.630	
	50% เอทานอล	ใบ 1	0.359	0.337
		ใบ 2	0.288	0.274
เนื้อ 1		0.573	0.562	
เนื้อ 2		0.570	0.561	
เมล็ด 1		0.628	0.623	
เมล็ด 2		0.622	0.625	
เปลือก 1		0.610	0.589	
เปลือก 2		0.606	0.602	
95 % เอทานอล		ใบ 1	0.532	0.530
		ใบ 2	0.529	0.526
	เนื้อ 1	0.488	0.486	
	เนื้อ 2	0.503	0.502	
	เมล็ด 1	0.601	0.617	
	เมล็ด 2	0.600	0.612	
	เปลือก 1	0.551	0.541	
	เปลือก 2	0.574	0.568	

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุุมโดยวิธี DPPH ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 2.5014 g ใน Ethanol 100 ml และทำการเจือจาง 20 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox พบว่าเมื่อนำค่า การดูดกลืนแสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.2 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Trolox เท่ากับ 68.09 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 6808.93 $\mu\text{g/ml}$

จากสมการ พบว่าสารสกัด 1 ml มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 680,893 μg

แสดงว่าสารสกัด 100 ml จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 6.808 mg

ถ้าตัวอย่างหนัก 2.5014 g มีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 6.808 mg ดังนั้น ในใบ 1 g จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูล DPPH เท่ากับ $\frac{6.808 \text{ mg}}{2.5014 \text{ g}} \times 1,000 = 2,721.67 \mu\text{g}$

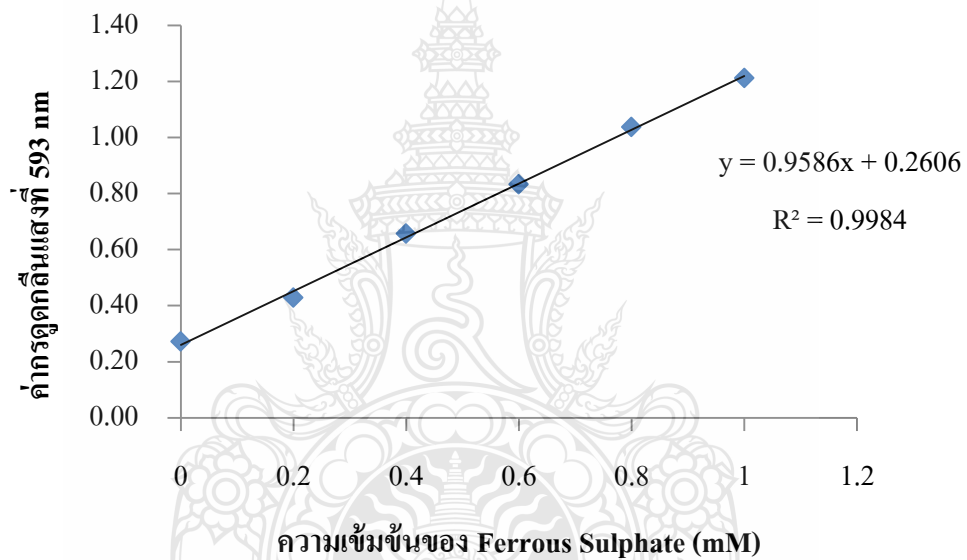
3. วิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก ดัดแปลงจากวิธีการของ Benzie and Strain (1996) ดังนี้ ผสมสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตรทที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายดังกล่าวที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปใช้ (FRAP reagent) ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้สารละลายตัวอย่างสกัดจำนวน 40 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ FRAP reagent ปริมาตร 1800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร รายงานความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของตัวอย่างแสดงในรูปของความเข้มข้น $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (มิลลิโมลาร์) [84]

3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous Sulphate ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก ตารางที่ ก.5 และภาพที่ ก.3

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous Sulphate ในการหาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมนที่ สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น(mM)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย
Ferrous Sulphate	0	0.274	0.269	0.271
	0.2	0.431	0.425	0.428
	0.4	0.682	0.632	0.657
	0.6	0.836	0.829	0.832
	0.8	1.053	1.023	1.038
	1	1.218	1.207	1.212



ภาพที่ ก.3 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Ferrous Sulphate ในการหาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมนที่ สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

3.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมนเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังตารางที่ ก.6

ตารางที่ ก.6 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก จากส่วนต่างๆของ
 มะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
น้ำ	ใบ 1	1.023	1.046
	ใบ 2	1.014	1.027
	เนื้อ 1	0.545	0.535
	เนื้อ 2	0.543	0.522
	เมล็ด 1	0.567	0.564
	เมล็ด 2	0.563	0.561
	เปลือก 1	0.545	0.535
	เปลือก 2	0.543	0.522
50% เอทานอล	ใบ 1	0.950	0.970
	ใบ 2	0.948	0.964
	เนื้อ 1	0.531	0.529
	เนื้อ 2	0.465	0.466
	เมล็ด 1	0.388	0.384
	เมล็ด 2	0.352	0.355
	เปลือก 1	0.372	0.377
	เปลือก 2	0.355	0.362
95 % เอทานอล	ใบ 1	0.604	0.609
	ใบ 2	0.587	0.587
	เนื้อ 1	0.268	0.263
	เนื้อ 2	0.260	0.264
	เมล็ด 1	0.265	0.266
	เมล็ด 2	0.273	0.299
	เปลือก 1	0.249	0.250
	เปลือก 2	0.253	0.249

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุมโดยวิธี วิเคราะห์
 ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 2.5014 g ใน Ethanol 100 ml
 และทำการเจือจาง 10 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Ferrous Sulphate พบว่าเมื่อ

นำค่า การดูดกลืนแสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.3 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Ferrous Sulphate เท่ากับ 3.96 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 395.78 µg/ml จากสมการ พบว่าสารสกัด 100 ml มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก เท่ากับ 39,578 mg ถ้าตัวอย่างหนัก 2.5014 g มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก เท่ากับ 0.3958 mg

ดังนั้น ในใบ 1 g จะมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก เท่ากับ $\frac{0.3958 \text{ mg}}{2.5014 \text{ g}} \times 1,000 = 158.22$ mg

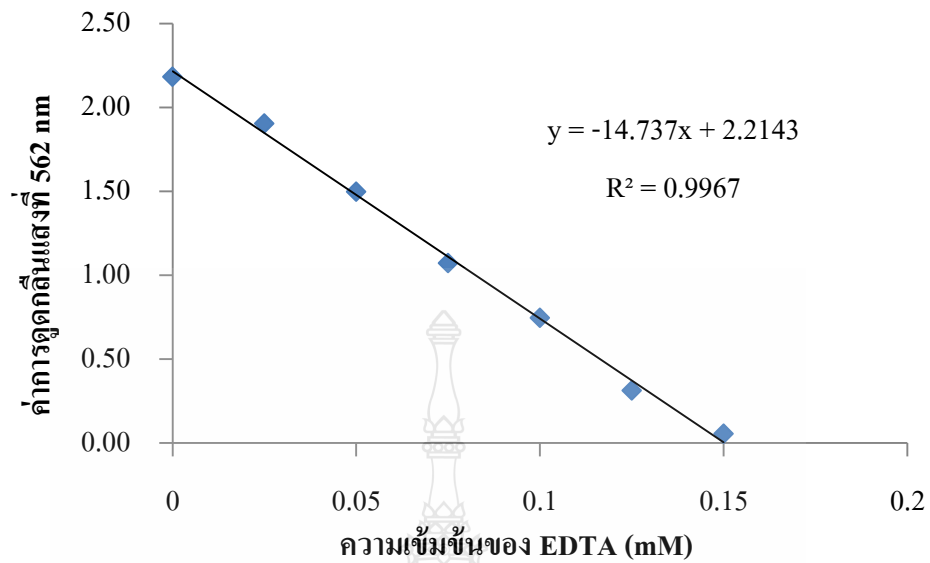
4. วิเคราะห์หาความสามารถในการแย่งจับกับ Fe²⁺ ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมนที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

การทดสอบความสามารถในการแย่งจับ Fe²⁺ ดัดแปลงวิธีการจาก Decker and Welch (1990) โดยใช้สารสกัดจำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นจำนวน 1400 ไมโครลิตรและสารละลาย FeCl₂·4H₂O เข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร รายงานความสามารถในการแย่งจับ Fe²⁺ ในรูปของความเข้มข้น EDTA (มิลลิโมลลาร์) [85]

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ EDTA ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับ Fe²⁺ ตารางที่ ก.7 และภาพที่ ก.4

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงของ EDTA ในการหาความสามารถในการแย่งจับกับ Fe²⁺ ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมนที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (mM)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย
EDTA	0	2.177	2.186	2.1815
	0.025	1.901	1.906	1.9035
	0.050	1.557	1.436	1.4965
	0.075	1.066	1.075	1.0705
	0.100	0.739	0.751	0.745
	0.125	0.307	0.315	0.311
	0.150	0.059	0.051	0.055



ภาพที่ ก.4 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน EDTA ในการหาความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจาก ส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

4.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆดังตารางที่ ก.8

ตารางที่ ก.8 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} จากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
น้ำ	ใบ 1	2.012	2.053
	ใบ 2	2.087	2.092
	เนื้อ 1	1.87	1.847
	เนื้อ 2	1.926	1.943
	เมล็ด 1	2.103	2.111
	เมล็ด 2	2.036	2.058
	เปลือก 1	1.984	1.998
	เปลือก 2	2.078	2.09
	ใบ 1	2.034	2.01
	ใบ 2	2.037	2.041

50% เอทานอล	เนื้อ 1	2.044	2.031
	เนื้อ 2	1.992	1.996
	เมล็ด 1	2.143	2.137
	เมล็ด 2	2.158	2.135
	เปลือก 1	2.069	2.082
	เปลือก 2	2.128	2.132
95 % เอทานอล	ใบ 1	2.117	2.132
	ใบ 2	2.053	2.071
	เนื้อ 1	2.048	2.036
	เนื้อ 2	2.018	2.027
	เมล็ด 1	2.114	2.108
	เมล็ด 2	2.074	2.087
	เปลือก 1	2.048	2.057
	เปลือก 2	2.102	2.083

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุมโดยวิธี วิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 2.5014 g ใน Ethanol 100 ml และทำการเจือจาง 5 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน EDTA พบว่าเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.4 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ EDTA เท่ากับ 0.03 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 3.05 $\mu\text{g/ml}$

จากสมการ พบว่าสารสกัด 100 ml มีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} เท่ากับ 0.0030 mg

ตัวอย่างหนัก 2.5014 g มีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} เท่ากับ 0.0030 mg

ดังนั้น ในใบ 1 g มีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} เท่ากับ $\frac{0.0030 \text{ mg}}{2.5014 \text{ g}} \times 1,000 = 1.22 \text{ mg}$

5. วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

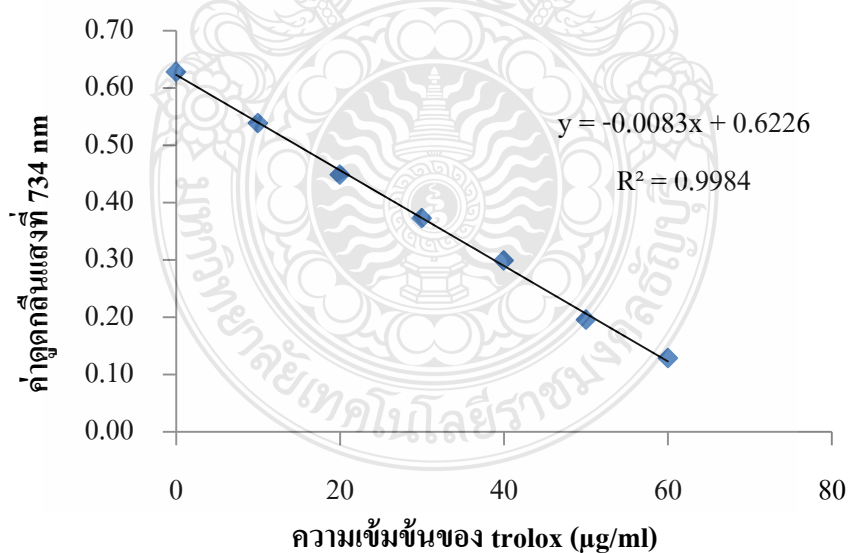
การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดัดแปลงวิธีการจาก Re et al. (1999) อนุมูล ABTS ถูกสร้างขึ้นด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยการผสมสาร ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2.45 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) เก็บไว้ที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS วิเคราะห์โดยเริ่มเจือจางสารละลายอนุมูลให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 (± 0.02) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) ปริมาตร 1980 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่มืดเป็น

เวลา 5 นาที วัดกิจกรรมที่ค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของตัวอย่างในรูปความเข้มข้นของ Trolox (มิลลิโมลลาร์) [83]

5.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ตารางที่ ก.9 และภาพที่ ก.5

ตารางที่ ก.9 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
Trolox	0	0.630	0.625	0.627
	10	0.550	0.526	0.53
	20	0.452	0.445	0.448
	30	0.364	0.381	0.372
	40	0.294	0.303	0.298
	50	0.199	0.191	0.195
	60	0.132	0.125	0.128



ภาพที่ ก.5 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

5.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังตารางที่ ก.10

ตารางที่ ก.10 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
น้ำ	ใบ 1	0.206	0.214
	ใบ 2	0.223	0.218
	เนื้อ 1	0.388	0.387
	เนื้อ 2	0.379	0.370
	เมล็ด 1	0.330	0.330
	เมล็ด 2	0.304	0.300
	เปลือก 1	0.446	0.455
	เปลือก 2	0.435	0.435
50% เอทานอล	ใบ 1	0.163	0.185
	ใบ 2	0.174	0.181
	เนื้อ 1	0.22	0.216
	เนื้อ 2	0.218	0.217
	เมล็ด 1	0.368	0.359
	เมล็ด 2	0.358	0.344
	เปลือก 1	0.342	0.339
	เปลือก 2	0.324	0.323
95 % เอทานอล	ใบ 1	0.311	0.326
	ใบ 2	0.316	0.321
	เนื้อ 1	0.538	0.522
	เนื้อ 2	0.529	0.535
	เมล็ด 1	0.555	0.545
	เมล็ด 2	0.537	0.549
	เปลือก 1	0.538	0.550
	เปลือก 2	0.510	0.512

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุมโดยวิธี ABTS ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

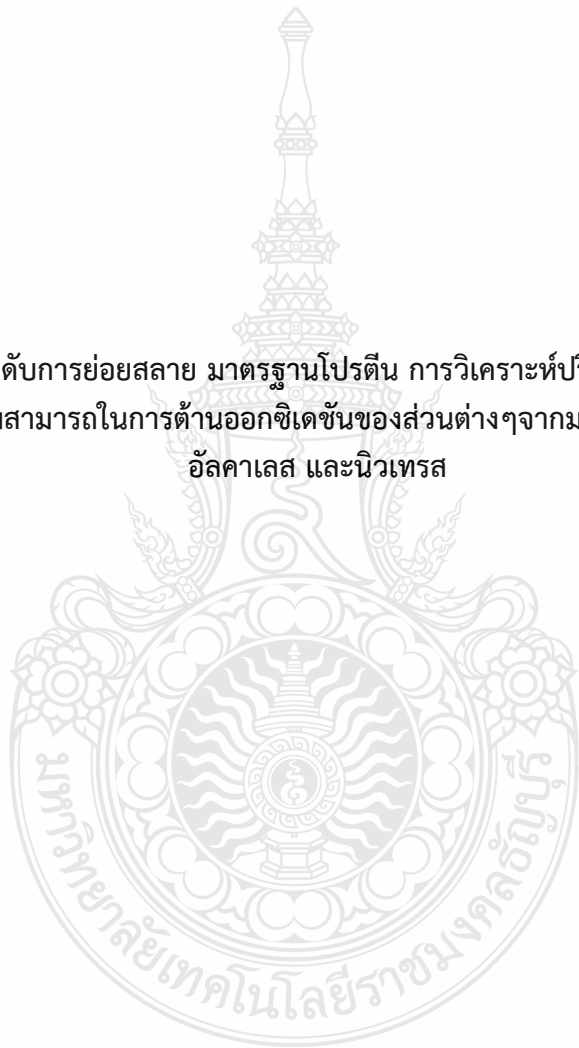
ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 2.5014 g ใน Ethanol 100 ml และทำการเจือจาง 10 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox พบว่าเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.5 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Trolox เท่ากับ 366.39 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 36638.55 $\mu\text{g/ml}$ จากสมการ พบว่าสารสกัด 1 ml มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 3,663,855 μg
 แสดงว่าสารสกัด 100 ml จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 36.6386 mg

ถ้าตัวอย่างหนัก 2.5014 g มีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 36.6386 mg

ดังนั้น ในเปลือก 1 g จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูล DPPH เท่ากับ $\frac{36.6386 \text{ mg}}{2.5014 \text{ g}} \times 1,000 = 14,647.22 \mu\text{g}$



ตอนที่ 2 การศึกษาระดับการย่อยสลาย มาตรฐานโปรตีน การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
ทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของส่วนต่างๆจากมะรุุมที่สกัดด้วยเอานไซม์
อัลคาเลส และนิวเทรส



1.การวิเคราะห์ค่าระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis, DH)

ค่าระดับการย่อยสลายวิเคราะห์ตามวิธีการของ Adler-Nissen (1979) ผสมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมาณ 50 ไมโครลิตรกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ต่อปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย TNBS ที่ความเข้มข้น 0.05% pH 8.2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 N ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าระดับการย่อยสลายที่มีค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ใช้สารละลาย L-leucine เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณค่าระดับการย่อยสลาย (%) ตามวิธีของ Benjakul and Morrissey (1997) ระดับการย่อยสลายคำนวณดังนี้ [79]

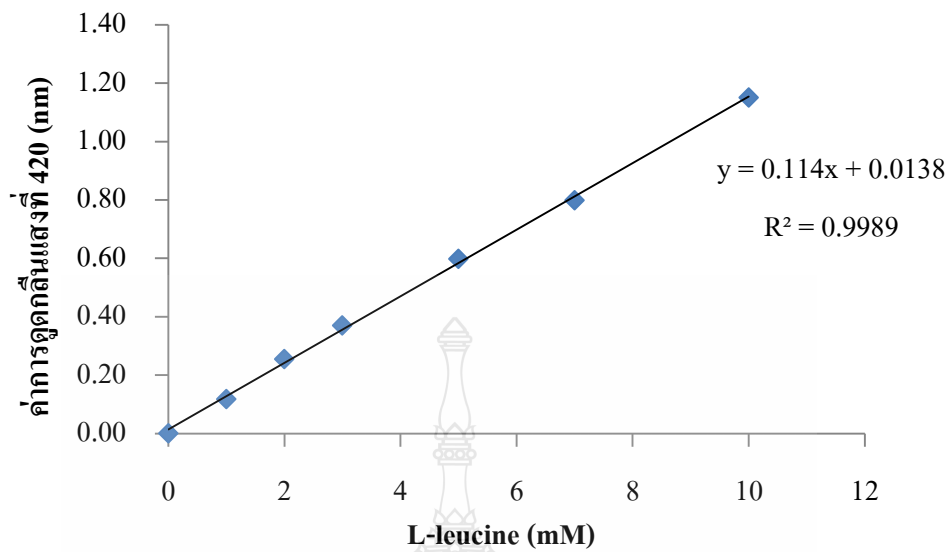
$$\text{Degree of hydrolysis (DH)} = [(hs - ho)/ht] \times 100\%$$

โดย hs = ปริมาณของ α -amino acid ของตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ, ho = ปริมาณของ α -amino acid ของตัวอย่างที่เวลาที่ 0 ชั่วโมง, ht = ปริมาณของ α -amino acid ทั้งหมดหลังจากย่อยด้วยกรด

1.1 ค่าการดูดกลืนแสง ของ L-leucine ที่เป็นสารมาตรฐาน ทดสอบระดับการย่อยสลาย ดังตารางที่ ก.11 และภาพที่ ก.6

ตารางที่ ก.11 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ L-leucine

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (mM)	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
L-leucine	0	0	0	0
	1	0.120	0.115	0.118
	2	0.251	0.259	0.255
	3	0.363	0.376	0.370
	5	0.602	0.594	0.598
	7	0.805	0.792	0.799
	10	1.152	1.149	1.151



ภาพที่ ก.6 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน L-leucine

1.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมเพื่อทดสอบระดับการย่อยสลายที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรสดังตารางที่ ก.12

ตารางที่ ก.12 ผลค่าการดูดกลืนแสงของค่าระดับการย่อยสลายจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
อัลคาเลส	อัลคาเลส 1 สภาวะ 0	0.364	0.376
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 0	0.367	0.371
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 2	0.398	0.391
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 2	0.390	0.398
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 4	0.447	0.449
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 4	0.446	0.449
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 6	0.518	0.527
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 6	0.521	0.525
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 8	0.598	0.578
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 8	0.588	0.589
นิวเทรส	นิวเทรส 1 สภาวะ 0	0.231	0.213
	นิวเทรส 2 สภาวะ 0	0.207	0.214

นิวเทรส	นิวเทรส 1 สภาวะ 2	0.401	0.406
	นิวเทรส 2 สภาวะ 2	0.395	0.389
	นิวเทรส 1 สภาวะ 4	0.448	0.437
	นิวเทรส 2 สภาวะ 4	0.443	0.434
	นิวเทรส 1 สภาวะ 6	0.464	0.473
	นิวเทรส 2 สภาวะ 6	0.466	0.452
	นิวเทรส 1 สภาวะ 8	0.565	0.547
	นิวเทรส 2 สภาวะ 8	0.553	0.531

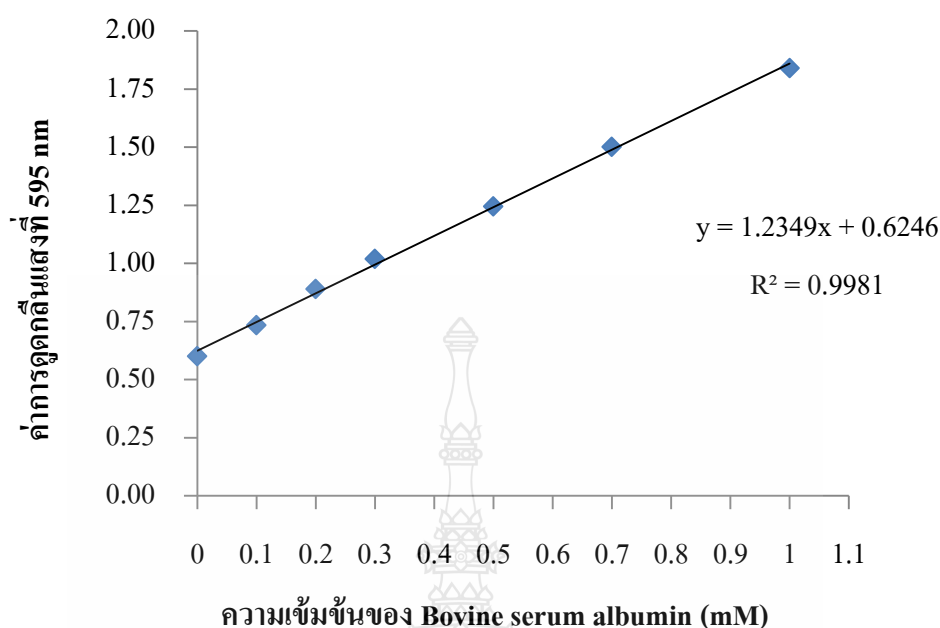
2. กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน (Bovine Serum Albumin)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาจาก Grimsley and Pace (2003) นำโปรตีนที่สกัดจากมะรุมปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค UV spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 200-960 nm จากนั้นเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (protein standard) ด้วยการละลายโบรินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin : BSA) 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 mg/ml ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้ในการสกัด ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค UV spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 200-960 นาโนเมตร และทำกราฟมาตรฐาน [81]

2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ Bovine serum albumin ที่เป็นสารมาตรฐาน ทดสอบมาตรฐานโปรตีนดังตารางที่ ก.13 และภาพที่ ก.7

ตารางที่ ก.13 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Bovine serum albumin

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (mM)	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
Bovine serum albumin	0.0	0	0	0
	0.1	0.120	0.115	0.118
	0.2	0.251	0.259	0.255
	0.3	0.363	0.376	0.370
	0.5	0.602	0.594	0.598
	0.7	0.805	0.792	0.799
	1.0	1.152	1.149	1.151



ภาพที่ ก.7 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

2.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส เพื่อทดสอบโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ดังตารางที่ ก.14

ตารางที่ ก.14 ผลค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin จากส่วนต่างๆของ

มะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส		ค่าการดูดกลืนแสง	
ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
อัลคาเลส	อัลคาเลส 1 สภาวะ 0	1.146	1.158
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 0	1.133	1.131
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 2	1.176	1.172
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 2	1.175	1.172
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 4	1.186	1.189
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 4	1.185	1.186
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 6	1.201	1.196
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 6	1.194	1.198
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 8	1.312	1.318
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 8	1.320	1.327

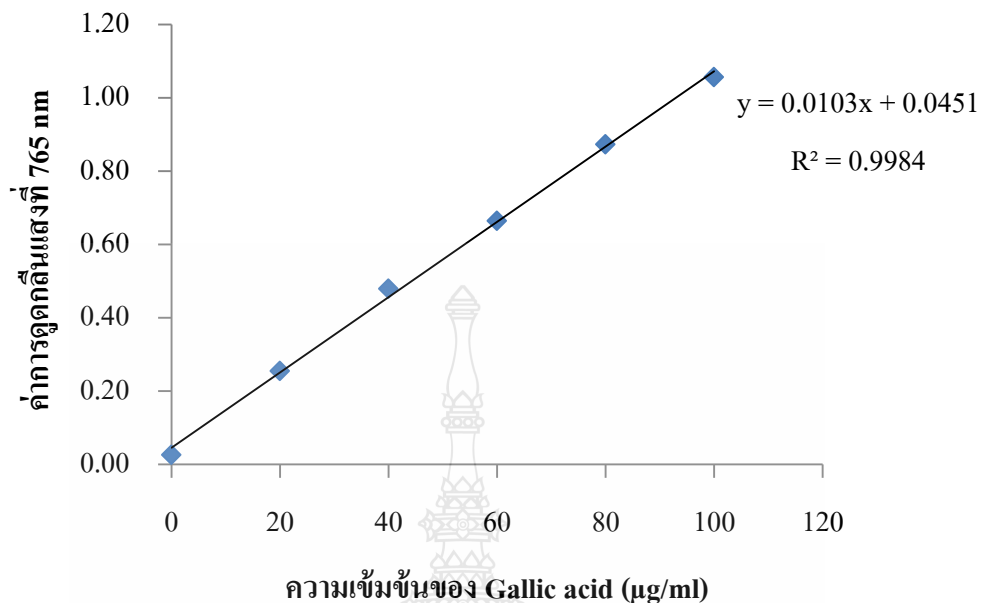
นิวเทรส	นิวเทรส 1 สภาวะ 0	0.975	0.939
	นิวเทรส 2 สภาวะ 0	0.972	0.981
	นิวเทรส 1 สภาวะ 2	1.020	1.029
	นิวเทรส 2 สภาวะ 2	1.024	1.028
	นิวเทรส 1 สภาวะ 4	1.049	1.047
	นิวเทรส 2 สภาวะ 4	1.052	1.058
	นิวเทรส 1 สภาวะ 6	1.084	1.082
	นิวเทรส 2 สภาวะ 6	1.080	1.081
	นิวเทรส 1 สภาวะ 8	1.109	1.092
	นิวเทรส 2 สภาวะ 8	1.193	1.094

3. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วย เอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

3.1 ค่าการดูดกลืนแสง ของ Gallic acid ที่เป็นสารมาตรฐาน ทดสอบปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด ดังตารางที่ ก.15 และภาพที่ ก.8

ตารางที่ ก.15 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
Gallic acid	0.0	0.027	0.025	0.026
	20.0	0.252	0.257	0.254
	40.0	0.481	0.477	0.479
	60.0	0.662	0.667	0.664
	80.0	0.870	0.877	0.873
	100.0	1.055	1.058	1.056



ภาพที่ ก.8 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Gallic acid ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

1.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และเอโนไซม์นิวเทรส เพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังตารางที่ ก.16

ตารางที่ ก.16 ผลค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
อัลคาเลส	อัลคาเลส 1 สภาวะ 0	0.521	0.524
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 0	0.525	0.523
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 2	0.611	0.593
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 2	0.594	0.598
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 4	0.621	0.623
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 4	0.616	0.620
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 6	0.649	0.656
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 6	0.654	0.658
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 8	0.679	0.682
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 8	0.677	0.675

นิวเทรส	นิวเทรส 1 สภาวะ 0	0.414	0.398
	นิวเทรส 2 สภาวะ 0	0.397	0.413
	นิวเทรส 1 สภาวะ 2	0.568	0.565
	นิวเทรส 2 สภาวะ 2	0.559	0.561
	นิวเทรส 1 สภาวะ 4	0.598	0.613
	นิวเทรส 2 สภาวะ 4	0.593	0.606
	นิวเทรส 1 สภาวะ 6	0.615	0.612
	นิวเทรส 2 สภาวะ 6	0.600	0.603
	นิวเทรส 1 สภาวะ 8	0.622	0.625
	นิวเทรส 2 สภาวะ 8	0.620	0.623

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ในการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบ 5.0032 g ใน Alcalase 200 ml และทำการเจือจาง 10 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Gallic acid พบว่าเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสง ของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.8 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Gallic acid เท่ากับ 46.44 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 9,287.94 $\mu\text{g/ml}$ จากสมการ พบว่าสารสกัด 1 ml มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 928,794 μg แสดงว่าสารสกัด 100 ml จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 9.2879 mg

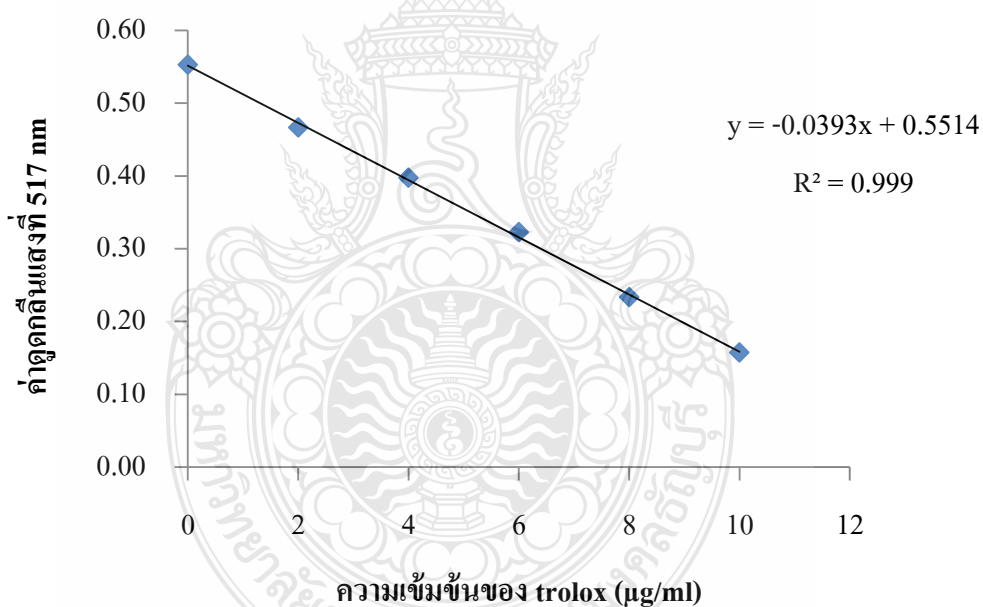
ถ้าตัวอย่างหนัก 5.0032 g มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 9.2879 mg ดังนั้นในใบ 1 g จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ $\frac{9.2879 \text{ mg}}{5.0032 \text{ g}} \times 1,000 = 1,856.40 \mu\text{g}$

4. วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตารางที่ ก.17 และภาพที่ ก.9

ตารางที่ ก.17 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และ นิวเทรส

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (µg/ml)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย
Trolox	0	0.558	0.547	0.552
	2	0.468	0.465	0.466
	4	0.395	0.400	0.397
	6	0.325	0.320	0.322
	8	0.238	0.229	0.233
	10	0.170	0.145	0.157



ภาพที่ ก.9 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และ นิวเทรส

4.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุ้มเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุ้มที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส ดังตารางที่ ก.18

ตารางที่ ก.18 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากส่วนต่างๆของมะรุ้มที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
อัลคาเลส	อัลคาเลส 1 สภาวะ 0	0.421	0.429
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 0	0.427	0.428
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 2	0.333	0.325
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 2	0.325	0.326
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 4	0.312	0.32
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 4	0.318	0.313
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 6	0.298	0.310
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 6	0.296	0.297
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 8	0.276	0.273
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 8	0.281	0.278
นิวเทรส	นิวเทรส 1 สภาวะ 0	0.484	0.478
	นิวเทรส 2 สภาวะ 0	0.482	0.479
	นิวเทรส 1 สภาวะ 2	0.465	0.467
	นิวเทรส 2 สภาวะ 2	0.469	0.461
	นิวเทรส 1 สภาวะ 4	0.462	0.455
	นิวเทรส 2 สภาวะ 4	0.46	0.456
	นิวเทรส 1 สภาวะ 6	0.457	0.456
	นิวเทรส 2 สภาวะ 6	0.455	0.459
	นิวเทรส 1 สภาวะ 8	0.433	0.459
	นิวเทรส 2 สภาวะ 8	0.442	0.449

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุ้มโดยวิธี DPPH สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 5.0032 g ใน Alcalase 200 ml และทำการเจือจาง 50 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox พบว่าเมื่อนำค่า การ

ดูดกลืนแสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.9 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Trolox เท่ากับ 160.81 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 32162.85 $\mu\text{g/ml}$ จากสมการ พบว่าสารสกัด 1 ml มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 3,216,285 μg แสดงว่าสารสกัด 100 ml จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH เท่ากับ 32.1628 mg

ถ้าตัวอย่างหนัก 5.0032 g มีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH เท่ากับ 32.1628 mg

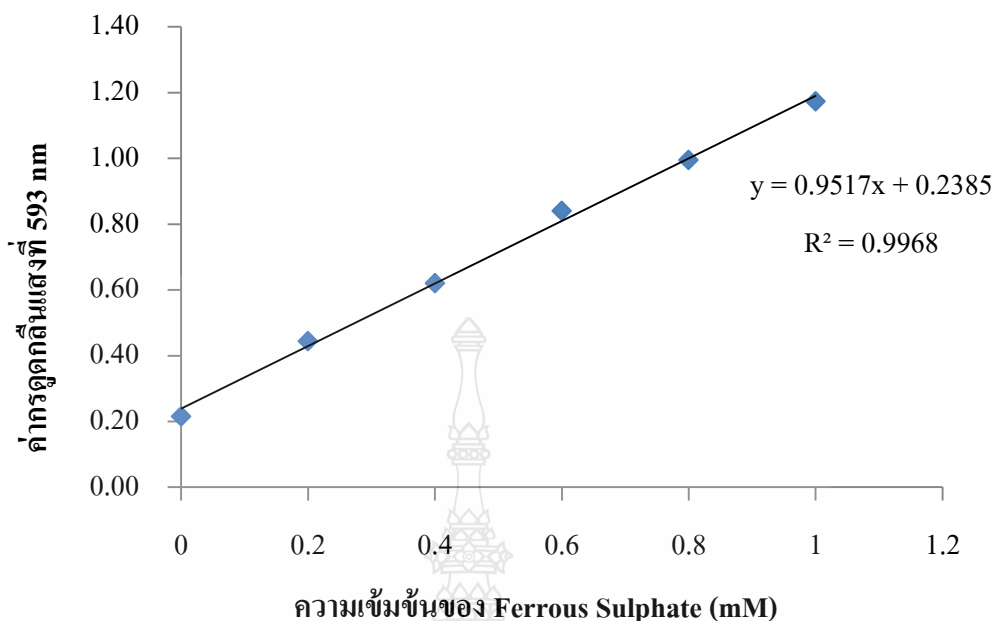
ดังนั้น ในใบ 1 g จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูลDPPH เท่ากับ $\frac{32.1628 \text{ mg}}{5.0032 \text{ g}} \times 1,000 = 6428.46 \mu\text{g}$

5. วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วย เอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

5.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous Sulphate ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกตารางที่ ก.19 และภาพที่ ก.10

ตารางที่ ก.19 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous Sulphate ในการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น(mM)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย
Ferrous Sulphate	0.0	0.211	0.219	0.215
	0.2	0.442	0.445	0.443
	0.4	0.614	0.626	0.620
	0.6	0.847	0.833	0.840
	0.8	0.992	0.998	0.995
	1.0	1.178	1.167	1.172



ภาพที่ ก.10 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Ferrous Sulphate ในการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมนที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

5.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมนเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกสกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส ดังตารางที่ ก.20

ตารางที่ ก.20 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกจากส่วนต่างๆของมะรุมนที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
อัลคาเลส	อัลคาเลส 1 สภาวะ 0	0.454	0.467
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 0	0.460	0.465
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 2	0.532	0.536
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 2	0.531	0.535
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 4	0.565	0.556
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 4	0.555	0.563
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 6	0.596	0.599
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 6	0.592	0.597

	อัลคาเลส 1 สภาวะ 8	0.669	0.657
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 8	0.668	0.661
นิวเทรล	นิวเทรล 1 สภาวะ 0	0.556	0.564
	นิวเทรล 2 สภาวะ 0	0.561	0.558
	นิวเทรล 1 สภาวะ 2	0.723	0.731
	นิวเทรล 2 สภาวะ 2	0.728	0.734
	นิวเทรล 1 สภาวะ 4	0.763	0.771
	นิวเทรล 2 สภาวะ 4	0.767	0.774
	นิวเทรล 1 สภาวะ 6	0.826	0.827
	นิวเทรล 2 สภาวะ 6	0.836	0.821
	นิวเทรล 1 สภาวะ 8	0.891	0.886
	นิวเทรล 2 สภาวะ 8	0.889	0.890

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุมโดยวิธี วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเพอริกที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรล

ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 5.0032 g ใน Alcalase 200 ml และทำการเจือจาง 20 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Ferrous Sulphate พบว่าเมื่อนำค่า การดูดกลืนแสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.10 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Ferrous Sulphate เท่ากับ 4.45 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 890.85 µg/ml จากสมการ พบว่าสารสกัด 100 ml มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเพอริก เท่ากับ 89,085 mg

ถ้าตัวอย่างหนัก 5.0032 g มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเพอริก เท่ากับ 0.8909 mg

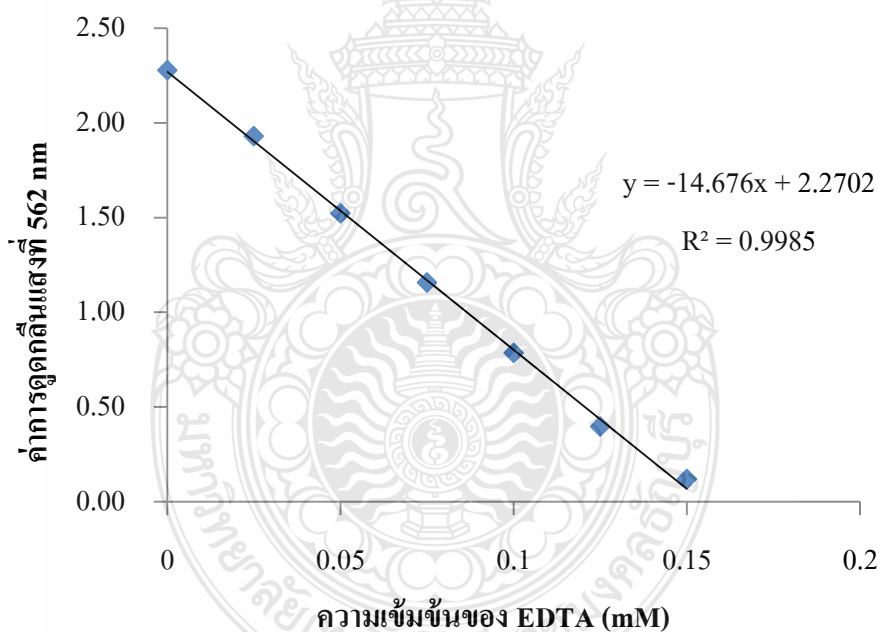
ดังนั้น ในใบ 1 g จะมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเพอริก เท่ากับ $\frac{0.8909 \text{ mg}}{5.0032 \text{ g}} \times 1,000 = 178.06 \text{ mg}$

6. วิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรล

6.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ EDTA ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ตารางที่ ก.21 และภาพที่ ก.11

ตารางที่ ก.21 ค่าการดูดกลืนแสงของ EDTA ในการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (mM)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย
EDTA	0	2.267	2.286	2.276
	0.025	1.971	1.889	1.930
	0.050	1.547	1.496	1.521
	0.075	1.169	1.145	1.157
	0.100	0.819	0.751	0.785
	0.125	0.408	0.385	0.396
	0.150	0.089	0.151	0.120



ภาพที่ ก.11 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน EDTA ในการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

6.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดผงมะรุุมเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และเอโนไซม์นิวเทรส ดังตารางที่ ก.22

ตารางที่ ก.22 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} จากส่วนต่างๆของ
 มะรุมที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
อัลคาเลส	อัลคาเลส 1 สภาวะ 0	0.411	0.412
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 0	0.416	0.414
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 2	0.391	0.398
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 2	0.392	0.397
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 4	0.281	0.282
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 4	0.282	0.283
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 6	0.264	0.262
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 6	0.271	0.278
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 8	0.154	0.147
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 8	0.151	0.148
นิวเทรส	นิวเทรส 1 สภาวะ 0	1.067	1.055
	นิวเทรส 2 สภาวะ 0	1.059	1.048
	นิวเทรส 1 สภาวะ 2	1.004	1.003
	นิวเทรส 2 สภาวะ 2	1.022	1.017
	นิวเทรส 1 สภาวะ 4	0.983	0.987
	นิวเทรส 2 สภาวะ 4	0.993	0.991
	นิวเทรส 1 สภาวะ 6	0.972	0.964
	นิวเทรส 2 สภาวะ 6	0.967	0.969
	นิวเทรส 1 สภาวะ 8	0.941	0.943
	นิวเทรส 2 สภาวะ 8	0.946	0.947

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุมโดยวิธีวิเคราะห์
 ความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 5.0032 g ใน Alcalase 200 ml
 และทำการเจือจาง 5 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน EDTA พบว่าเมื่อนำค่าการดูดกลืน
 แสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.11 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ EDTA เท่ากับ
 0.63 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 126.65 $\mu\text{g/ml}$

จากสมการ พบว่าสารสกัด 100 ml มีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} เท่ากับ 12,665 mg

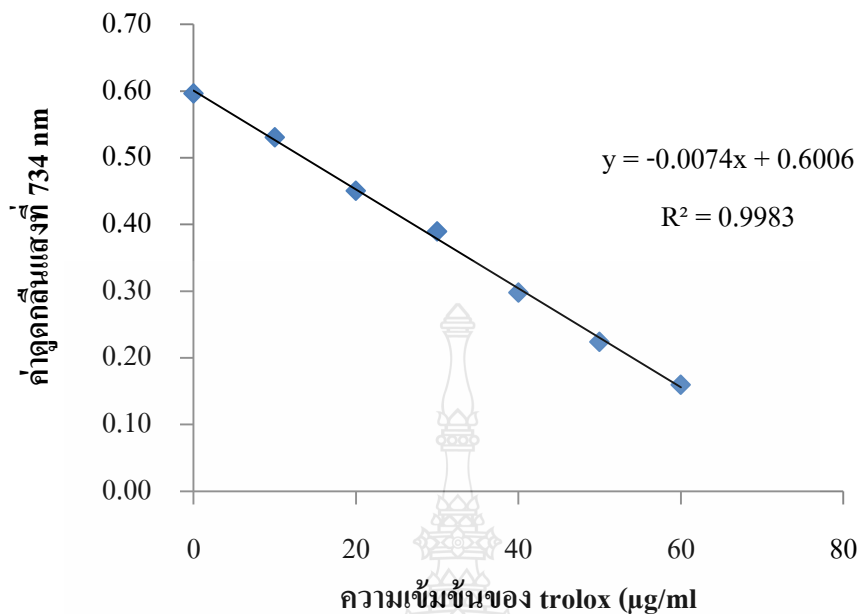
ตัวอย่างหนัก 5.0032 g มีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} เท่ากับ 0.1266 mg ดังนั้น ในใบ 1 g มีความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} เท่ากับ $\frac{0.1266 \text{ mg}}{5.0032 \text{ g}} \times 1,000 = 25.31 \text{ mg}$

7. วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของ มะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

7.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ที่เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ตารางที่ ก.23 และภาพที่ ก.12

ตารางที่ ก.23 ผลค่าการดูดกลืนแสงของ Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง		ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
Trolox	0	0.592	0.6	0.596
	10	0.532	0.529	0.530
	20	0.446	0.455	0.450
	30	0.389	0.39	0.389
	40	0.312	0.283	0.297
	50	0.227	0.22	0.223
	60	0.158	0.161	0.159



ภาพที่ ก.12 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีวิเคราะห์ ABTS ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์ อัลคาเลส และนิวเทรส

7.2 ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดผงมะรุมเพื่อทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และเอโนไซม์นิวเทรสดังตารางที่ ก.24

ตารางที่ ก.24 ผลค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากส่วนต่างๆ ของมะรุมที่สกัดด้วยเอโนไซม์อัลคาเลส และนิวเทรส

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
อัลคาเลส	อัลคาเลส 1 สภาวะ 0	0.521	0.524
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 0	0.525	0.523
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 2	0.611	0.593
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 2	0.594	0.598
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 4	0.621	0.623
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 4	0.616	0.620
	อัลคาเลส 1 สภาวะ 6	0.649	0.656
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 6	0.654	0.658

	อัลคาเลส 1 สภาวะ 8	0.679	0.682
	อัลคาเลส 2 สภาวะ 8	0.677	0.675
นิวเทรส	นิวเทรส 1 สภาวะ 0	0.414	0.398
	นิวเทรส 2 สภาวะ 0	0.397	0.413
	นิวเทรส 1 สภาวะ 2	0.568	0.565
	นิวเทรส 2 สภาวะ 2	0.559	0.561
	นิวเทรส 1 สภาวะ 4	0.598	0.613
	นิวเทรส 2 สภาวะ 4	0.593	0.606
	นิวเทรส 1 สภาวะ 6	0.615	0.612
	นิวเทรส 2 สภาวะ 6	0.600	0.603
	นิวเทรส 1 สภาวะ 8	0.622	0.625
	นิวเทรส 2 สภาวะ 8	0.620	0.623

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะรุมโดยวิธี ABTS ที่สกัดด้วย เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์นิวเทรส

ในการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบ 5.0032 g ใน Alcalase 200 ml และทำการเจือจาง 50 เท่า เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน Trolox พบว่าเมื่อนำค่า การดูดกลืนแสงของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพที่ ก.12 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ Trolox เท่ากับ 993.92 µg/ml เมื่อนำมาคำนวณกลับค่าความเจือจางคิดเป็น 198,783.78 µg/ml

จากสมการ พบว่าสารสกัด 1 ml มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 19,878,378 µg

แสดงว่าสารสกัด 100 ml จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 198.7838 mg

ถ้าตัวอย่างหนัก 5.0032 g มีปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 198.7838 mg

ดังนั้น ในใบ 1 g จะมีปริมาณการยับยั้งอนุมูล DPPH เท่ากับ $\frac{198.7838 \text{ mg}}{5.0032 \text{ g}} \times 1,000 = 39,731.33 \mu\text{g}$

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายอุกฤต มากศรทรง
วัน เดือน ปีเกิด	31 ตุลาคม 2536
สถานที่สามารถติดต่อได้	995/1 หมู่ 9 ต.นครสวรรค์ตก อ.เมืองนครสวรรค์ จ.นครสวรรค์ 60000
การศึกษา	- ปีการศึกษา 2554 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสตรีนครสวรรค์ - ปีการศึกษา 2558 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การอาหาร) คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
เบอร์โทรศัพท์	080-1144774
อีเมล	ukit_m@mail.rmutt.ac.th

