รหัสโครงการ 2556A10802019

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายพันธุ์ต่างๆ หลังผ่านกระบวนการย่อยในหลอดทดลอง

Antioxidant activity of some orange juices after *in vitro* digestion

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๖

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๖

ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรสา สุริยาพันธ์ จากภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยมาตั้งแต่ต้นจนทำให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ยังต้องขอบคุณนิสิตชั้นปีที่ ๔ ของภาควิชาชีวเคมี และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่ร่วมมือร่วมใจกันในการทำวิจัยจนทำให้ได้ผลการวิจัยอันน่าพึงพอใจ ตลอดจนคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในโครงการวิจัยนี้

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ
หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายพันธุ์ต่างๆ หลังผ่านกระบวนการย่อยในหลอดทดลอง

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Antioxidant activity of some orange juices after *in vitro* digestion

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันน้ำผลไม้ในตระกูลส้มได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีประโยชน์ที่ดีต่อสุขภาพ เพราะอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคหัวใจและโรคมะเร็ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่เกี่ยวกับน้ำผลไม้ตระกูลส้มหลังผ่านกระบวนการย่อยอาหารแล้วจะส่งผลต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างไรบ้าง ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้จึงทำขึ้นเพื่อตรวจสอบอิทธิพลของสภาวะการย่อยอาหารในร่างกาย ในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก เพื่อตรวจดูเสถียรภาพของสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการย่อยในหลอดทดลองของน้ำผลไม้ในตระกูลส้ม น้ำผลไม้ในตระกูลส้มที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มสายน้ำผึ้ง น้ำส้มโอ น้ำส้มเข้มข้น น้ำมะกรูด และน้ำมะนาว ในการประเมินผลใช้วิธีการตรวจสอบปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ทั้งก่อนและหลังการย่อยรวมทั้งฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ผลจากการทดสอบน้ำผลไม้ตัวอย่างก่อนการย่อยในหลอดทดลอง พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลอยู่ในช่วง 0.32-0.09 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 2.38-9.80 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง 12.96-96.28% และมีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.08-5.52 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง หลังผ่านการย่อยในหลอดทดลองพบว่ามีปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลดลง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลอยู่ในช่วง 0.02-0.04 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 1.01-1.18 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง 24.68-72.85% และมีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.01-2.11 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำส้มเข้มข้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด (IC_{50}= 0.25±6.41

เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นจึงสรุปได้ว่า ระบบการย่อยอาหารมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ในตระกูลส้ม

Abstract

Citrus fruit juices have taken great attention for their health benefits with high variety of antioxidants such as phenolic compounds and flavonoids, which have protective effects against heart disease and cancers. Nevertheless, very little informations are known about the antioxidant activity of citrus fruit juices during the digestion process. The aim of this study was to examine the influence of digestive condition in gastrointestinal system on the antioxidant capacities and antioxidant compounds of citrus fruit juices including mandarin, tangerine, pomelo, orange juice concentrate, leech lime and lime juices. The antioxidant activity and antioxidant compounds of some citrus fruit juices both before and after in *vitro* digestion were evaluated by DPPH scavenging activity, FRAP assay, total phenolic contents (TPC) and total flavonoid contents (TFC). Additionally, superoxide radical scavenging activity was also determined. The results revealed that before *in vitro* digestion the bioaccessible total phenolic content (0.32-0.09 mg GAE/mL), total flavonoid content (2.38-9.8 mg of hesperidin/mL) and antioxidant activity DPPH scavenging activity (12.96-96.28% inhibition), FRAP value (0.08-5.52 mM/mL). Although, antioxidant compounds and antioxidant activity before *in vitro* digestion have highest value but the results observed that after *in vitro* digestion decreased the antioxidant compounds total phenolic content (0.02-0.04 mg GAE/mL), total flavonoid content (1.01-1.18 mg of hesperidin/mL) and antioxidant activity DPPH scavenging activity (24.68-72.85% inhibition), FRAP value (0.01-2.11 mM/mL) ($p<0.05$). Moreover, we found that orange juice concentrate had the highest inhibitory effect against superoxide radical with IC_{50} = 0.25±6.41%. Thus, the present study can be concluded that digestive system effect to the bioaccessibility of citrus fruit juice.

สารบัญ

สารบัญรูป

หน้า

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

สารบัญตาราง

หน้า

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ปัจจุบันประชาชนทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยหันมานิยมใช้สมุนไพรทั้งในแง่เป็นยา อาหาร ในสภาพสังคมปัจจุบันนี้ผู้บริโภคหลายๆ คนหันมาใส่ใจกับสุขภาพตัวเองกันมากขึ้น โดยกระแสการรักสุขภาพนั้นได้ส่งผลต่อการอุปโภคและบริโภคสินค้าที่หลากหลายชิ้น ส่งผลให้กลุ่มสินค้าเพื่อสุขภาพมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง เช่น เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ อาหารเสริม รวมไปถึงเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของน้ำผักและผลไม้ ในปี 2550 ตลาดน้ำผักและผลไม้มีมูลค่ากว่า 7,500 ล้านบาทโดยกลุ่มผู้บริโภคที่ต้องการทั้งในเรื่องของสุขภาพและดื่มเพื่อความสดชื่นดับกระหาย อีกทั้งผลไม้ไทยมีความหลากหลายทั้งชนิด และคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ลักษณะทางภูมิประเทศของไทยก็เอื้ออำนวยต่อการเพาะปลูก ทำให้คนไทยหรือเกษตรกรไทยเป็นผู้นำทางด้านการผลิตไม้ผล แต่ที่ผ่านมาการนำเสนอหรือให้ข้อมูลเกี่ยวกับผลไม้ไทยแก่ผู้บริโภคในแง่มุมด้านโภชนาการยังคงมีค่อนข้างน้อย หรือหากมีก็ยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์หรือผลงานวิจัยอ้างอิงอย่างชัดเจน

รูปแบบหนึ่งของผลไม้ที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย คือ น้ำคั้นจากผลไม้ต่างๆ ดังจะเห็นได้จากสัดส่วนการตลาดที่เพิ่มมากขึ้นและยังคงมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องทุกปี หลายบริษัทมีการเติบโตอย่างต่อเนื่องด้วยสินค้าประเภทเครื่องดื่มน้ำผลไม้พร้อมดื่ม โดยเฉพาะในกลุ่มตลาดน้ำผลไม้เพื่อสุขภาพ 100% ซึ่งเป็นกลุ่มตลาดของผู้บริโภคที่สนใจในเรื่องของการดูแลรักษาสุขภาพ ส้มไทยเองมีหลากหลาย แต่ที่ผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นน้ำส้มคั้นที่กำลังเป็นที่นิยมและมีให้เลือกหลายยี่ห้อในท้องตลาด

จะเห็นได้ว่ารายงานเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีในผลไม้ไทย เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงจากอนุมูลอิสระที่เข้าไปทำลายเซลล์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดต่างๆ มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็งตลอดจนโรคเรื้อรังต่างๆ งานวิจัยของ Cilla และคณะ (2011) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ พบว่า น้ำส้มสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยดูจากค่า ORAC (16.4%) และค่า TEAC (12.8%) นอกจากนี้ Pothitirat และคณะ (2009) ยังพบว่าในเปลือกส้มมีสารดี-ไลโมนีน (น้ำมันหอมระเหย) เทอปีน เฮสเพอริดีน (ยาป้องกัน การตกเลือดโดยลดความเปราะของเส้นเลือด) คูมาริน (สารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย) และแคโรทีนอยด์ (สารสีเหลืองช่วยต้านอนุมูลอิสระ) สามารถลดความเสี่ยงของการเป็นมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีสารประกอบในกลุ่ม xanthone ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย รา และ

มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ที่สำคัญยังช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human leukemia HL60 cells) โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis และป้องกันการออกซิเดชันของ LDL ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเพื่อให้เข้าใจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันหลังจากผ่านกระบวนการย่อยอาหารแล้วของน้ำส้มสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานอันจะเป็นจุดเริ่มต้นที่จะนำไปสู่การบริโภคด้วยความเชื่อมั่นและปรับปรุงผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของพืชที่มีอยู่แล้วในประเทศให้ยั่งยืนต่อไป

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เป็นสิ่งที่สำคัญ หากแต่การศึกษาหาสิ่งที่จะนำมารักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคโดยเฉพาะสารที่ได้รับจากธรรมชาตินั้นน่าจะยิ่งมีความสำคัญมากกว่า ภายใต้สภาวะของอุบัติการณ์จากโรคต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเรื้อรังอันเกิดจากความไม่สมดุลของสารต่างๆ ภายในร่างกาย รูปแบบการดำรงชีวิตที่เปลี่ยนไป รูปแบบการบริโภคอาหารที่ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเหล่านี้แทบทั้งสิ้น

สารพฤกษเคมีที่พบในพืชมีความสำคัญในการป้องกันโรคเรื้อรังต่างๆ ปัจจุบันพบว่าสารพฤกษเคมีหลายชนิดทำหน้าที่เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ได้ดีกว่าวิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีนในอาหารชนิดเดียวกัน โดยจะมีกลไกในการลด oxidative stress ที่เป็นตัวทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Chu และคณะ, 2002) ซึ่ง oxidative stress เป็นผลมาจากทั้งการลดลงของปริมาณแอนติออกซิแดนท์ที่มีอยู่ภายในเซลล์ และการเพิ่มขึ้นของ reactive oxygen หรือ reactive nitrogen ต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เมื่อความสมดุลระหว่างปัจจัยทั้งสองชนิดในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไปจนสร้างความเสียหายให้กับโมเลกุลต่างๆ ถ้าซ่อมแซมไม่ได้ก็จะส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยอาจเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ หรืออาจทำให้เกิดการไขว้กันของสายดีเอ็นเอ และบางครั้งอาจก่อให้เกิดความเสียหายหรือมีการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม

จากการค้นคว้าข้อมูลจากแหล่งต่างๆ พบว่า อนุมูลอิสระจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและมีความเป็นพิษสูงเป็นอันตรายต่อส่วนประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ อนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดขึ้นตลอดเวลาจากกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย การออกกำลังกายอย่างหักโหม ความเครียด การติดเชื้อ การอักเสบ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น มลพิษในอากาศ ฝุ่น ควันบุหรี่ แสงแดด ความร้อน รังสี และยาบางชนิด อนุมูลอิสระแต่ละโมเลกุลที่สร้างขึ้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา

ลูกโซ่ ซึ่งจะดำเนินต่อไปเรื่อยๆ จนกว่าจะถูกกำจัดทิ้ง อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกไซด์เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นความเสียกายจะไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้น แต่จะขยายวงกว้างไปยังองค์ประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์ การศึกษาหาสารออกฤทธิ์จากพืชต่างๆ โดยเฉพาะพืชที่นำมาใช้เป็นอาหารอยู่แล้วอย่างผักและผลไม้ซึ่งมีผลต่อการลดความเสี่ยงอันอาจจะเกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจากกระบวนการที่จะนำมาอธิบายให้ชัดเจนนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด มีเพียงสมมติฐานที่ตั้งขึ้นมาเป็นแนวทางเพื่อรอการพิสูจน์ต่อไป

นอกจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้ว ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวของน้ำส้มสายพันธุ์ต่างๆ หลังผ่านกระบวนการย่อยอาหารซึ่งถูกจำลองขึ้นมาในระบบหลอดทดลองว่า ฤทธิ์ดังกล่าวจะยังคงมีอยู่หรือไม่ มากน้อยเพียงใด ดังนั้นการเปรียบเทียบผลทั้งก่อนและหลังจากที่ผ่านการย่อยน่าจะนำมาซึ่งความเข้าใจในกลไกของการต่อต้านกระบวนการดังกล่าว ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่น่าสนใจที่จะหยุดยั้งอุบัติการณ์ของโรคเรื้อรังต่างๆ อันเป็นสาเหตุการตายลำดับต้นๆ ในปัจจุบัน

อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมีความหลากหลายของพืชมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก ด้วยความหลากหลายของระบบนิเวศน์และพันธุ์ไม้ต่างๆ อย่างอุดมสมบูรณ์จึงเป็นแหล่งสำคัญของพืชผักผลไม้หลายชนิด ส้มในประเทศไทยเองก็มีหลากหลายสายพันธุ์ที่มีสรรพคุณทางยา เช่น เป็นยาแก้ปวดข้อ ท้องอืดแน่น แก้ปวดหัว (ตำพอกที่ศีรษะ) แก้ปวดกระเพาะอาหาร แก้ปวดกระบังลม ขับเสมหะ ขับลม แก้เมาสุรา ขับลมในลำไส้และกระเพาะอาหาร ทำให้เจริญอาหารเหมาะสำหรับสตรีมีครรภ์เบื่ออาหาร ปากไม่รู้รสอาหาร เป็นยาขับลม ช่วยขับเสมหะ แก้อึดอัด แน่นหน้าอก ไอ จุกแน่น ปวดท้องน้อย ไส้เลื่อน หรือต้มน้ำอาบแก้คัน ใช้ตำพอกฝี แก้ไส้เลื่อน แก้ปวดท้อง ลำไส้เล็กหดตัวผิดปกติ แก้ไอ แก้ปวด ปวดท้องน้อยและกระเพาะอาหาร ไส้เลื่อน คลายร้อน และป้องกันไข้หวัดได้เป็นอย่างดี มีวิตามินซี ซึ่งมีสรรพคุณช่วยป้องกันไขมันอุดตันในเส้นเลือด ช่วยย่อยอาหาร บำรุงม้าม บำรุงอวัยวะภายใน บำรุงระบบประสาท และยังแก้อาการท้องเดินได้อีกด้วย มีรายงานว่าส้มบางชนิดสามารถใช้รักษาอาการอักเสบ แก้ไข้ และขับเสมหะ แก้อาการเจ็บคอ แต่เนื่องจากในปัจจุบันยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มารองรับการนำไปใช้ที่ชัดเจน จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ไทยภายหลังจากที่ถูกย่อยโดยระบบย่อยอาหารในหลอดทดลองว่าจะยังคงมีฤทธิ์หรือไม่ มากน้อยเพียงใด เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการบริโภคน้ำผลไม้ไทย และเพื่อลดการนำเข้าน้ำผลไม้จากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจนำมาสู่การใช้อาหารเป็นยาเพื่อรักษาโรคต่างๆ หรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพซึ่งมีอยู่ในประเทศของเราเองต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์จากน้ำส้มสายพันธุ์ต่างๆ
2. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของน้ำส้มสายพันธุ์ต่างๆ
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังผ่านกระบวนการย่อยอาหารในหลอดทดลอง (*in vitro* digestion)

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ซื้อน้ำส้มจากซุปเปอร์มาร์เก็ตต่างๆ และที่คั้นเองจากส้มในตลาดท้องถิ่นในอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี มาทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จากนั้นนำน้ำผลไม้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งก่อนและหลังการถูกย่อยอาหารซึ่งถูกจำลองขึ้นมาในหลอดทดลอง แล้วศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำผลไม้ไทยต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐาน

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ผลไม้ไทยมีความหลากหลายทั้งชนิด และคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกัน อีกทั้งลักษณะทางภูมิประเทศของไทยก็เอื้ออำนวยต่อการเพาะปลูก ทำให้คนไทยหรือเกษตรกรไทยเป็นผู้นำทางด้านการผลิตไม้ผล แต่ที่ผ่านมาการนำเสนอหรือให้ข้อมูลเกี่ยวกับผลไม้ไทยแก่ผู้บริโภคในแง่มุมด้านโภชนาการยังคงมีค่อนข้างน้อย หรือหากมีก็ยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์หรือผลงานวิจัยอ้างอิงอย่างชัดเจน ผลไม้ไทยอย่างเช่น ส้มเขียวหวาน 100 กรัม จะมีเบต้าแคโรทีน 82 ไมโครกรัม และวิตามินซี 42 มิลลิกรัม จึงใช้รักษาและป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน เปลือกผลแห้งจะมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งประกอบด้วย ซิตรัล เจอรานิออล และไลนาโลออล ซึ่งน้ำมันหอมระเหยนี้สามารถสกัดออกมาเพื่อใช้แต่งกลิ่นยาและมีฤทธิ์ขับลม นอกจากนี้เปลือกผลแห้งเมื่อนำมาจุดไฟจะมีกลิ่นหอมและสามารถไล่ยุงได้ดี เป็นผลไม้ที่มีรสหวานอมเปรี้ยว มีวิตามินเอสูงมาก ตามด้วยวิตามินซีที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมากมาย ซึ่งมีฤทธิ์ช่วยป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟันเสริมสร้างคอลลาเจนช่วยทำให้แผล หายเร็วขึ้น ช่วยเป็นยาระบายอ่อน ๆ ในเปลือกผิวส้มมีน้ำมันหอมระเหยช่วยแก้วิงเวียนศีรษะ ช่วยบำรุงผิวพรรณให้สวยเปล่งปลั่งมีน้ำมีนวลผิวเกลี้ยงเกลาและสดชื่นขจัดความหมองคล้ำ และชะลอการเกิดริ้วรอย นิยมกินผลสดนำมาทำเป็นเครื่องดื่มและเป็นส่วนผสมในการบำรุงผิวภายนอก ส้มสายน้ำผึ้งมีคุณสมบัติในการแก้บิด ท้องเสีย ถ่ายเป็นเลือด แผลเปื่อย ปวดเมื่อยตามข้อ ขับปัสสาวะ ลดไข้ แก้ไข้หวัด ดอกตูมใช้แก้ลำไส้อักเสบ ท้องเสีย ส้มหลายพันธุ์มีปริมาณวิตามิน เกลือแร่ และเส้นใยอาหารอยู่

มากมาย มีสรรพคุณช่วยย่อยอาหาร เสริมสร้างการดูดซึมอาหารของร่างกาย ลดความร้อนของร่างกาย และยังช่วยแก้กระหาย หากรับประทานส้มเป็นประจำแล้วจะช่วยลดความเสี่ยงของการเป็นโรคไตอักเสบ และโรคความดันโลหิตสูงได้ (Fuhrman และคณะ, 2005) ปัจจุบันจึงมีการนำส้มไทยหลายสายพันธุ์มาทำเป็นเครื่องดื่ม หรือกินในรูปของขนมน้ำเชื่อมกินกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสำหรับการเจริญของผลไม้หลายชนิด ถึงแม้จะเป็นที่ทราบกันดีในกลุ่มหมอยาและแพทย์แผนไทยว่าส้มมีสรรพคุณต่างๆ มากมาย แต่หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีรายงานส่วนใหญ่ยังไม่ชัดเจน โดยเฉพาะข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันโดยเฉพาะหลังจากที่กินเข้าไปแล้วเกิดกระบวนการย่อยยังมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งทำให้เกิดข้อกังขาได้ว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์จากผลไม้ไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำส้มซึ่งมีการผลิตอย่างแพร่หลายจะมีผลต่อกระบวนการต่างๆ เหล่านี้หรือไม่ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าว ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้เพื่อเป็นหลักฐานสนับสนุนถึงความปลอดภัยและเห็นคุณค่าของการใช้ผลไม้ไทยเป็นยาในงานสาธารณสุขมูลฐานและส่งเสริมคุณค่าของผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นสินค้าเพื่อสุขภาพในลำดับต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำส้มหลังจากที่ผ่านการย่อยแล้วจะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของผลไม้ไทย หรือผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากผลไม้ไทย และนำข้อมูลที่ได้จดองค์ความรู้ที่ได้ในรูปสิทธิบัตรได้ ทำให้องค์ความรู้นี้เป็นของประเทศไทย และยังสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยไปเป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นสินค้าสำหรับบริโภคได้อย่างมั่นใจ

1.6.2 บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำส้มหลังจากผ่านการย่อยแล้ว จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าของผลไม้ไทย เพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกและอนุรักษ์ผลไม้ไทยมากขึ้น โดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่นรายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ รวมทั้งข้อมูลที่ได้จะถูกนำเผยแพร่ผ่านอินเตอร์เน็ต เพื่อเป็นการประชาสัมพันธ์ให้ประชาชนได้ทราบข้อเท็จจริงและคุณค่าของน้ำส้มโดยเฉพาะหลังจากที่ผ่านการย่อยแล้วว่าฤทธิ์ทางชีวภาพจะยังคงมีหรือไม่ มากน้อยเพียงใด

1.6.3 บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

ส้มเป็นพืชที่มีศักยภาพต่อการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ เพราะมีการเพาะเลี้ยงได้ ขึ้นได้ทั่วไปในประเทศไทย ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จะเป็นสิ่งยืนยันถึงประสิทธิภาพของส้มในการนำมาใช้เป็นอาหาร หรือ เครื่องดื่ม เป็นสมุนไพรในเครื่องสำอาง ส่งเสริมการขายให้กลุ่มวิสาหกิจชุมชน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์มากขึ้น และผู้ผลิตสามารถขยายตลาดออกไปสู่วงกว้างมากขึ้น รวมทั้งการนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ทำยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างอื่นได้อีก

นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของส้มอาจเป็นสารชนิดใหม่และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารแอนติออกซิแดนท์เดิมในอุตสาหกรรมอาหารและยา หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจเพื่อนำไปผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.6.4 เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมและโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระกันมาก จะทำให้ได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลงเนื่องจากเป็นการใช้อาหารเป็นยา นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จคาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จำนวนไม่น้อยกว่า 1 คน และเป็นโครงงานวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรีประมาณ 1 โครงงาน

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยา และชุมชน และประชาชนมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับการบริโภคน้ำผลไม้ไทย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel)
2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 บริษัท Watman ประเทศสหราชอาณาจักร
3. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
4. คิวเวตควอทซ์ (quartz cuvette) ขนาด 5 มิลลิลิตร
5. ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 20 - 200 ไมโครลิตร และ 100 – 1000 ไมโครลิตร บริษัท Lio Lab ประเทศไทย
6. ไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม
7. หลอดพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
8. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง บริษัท Precsia ประเทศสมาพันธรัฐสวิส
9. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) บริษัท GAST ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แบบไมโครเพลท บริษัท VERSAMAX ประเทศแคนาดา
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แบบ UV/VIS Spectrophotometer บริษัท ANALYTICAL LAB SCIENCE ประเทศไทย
12. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) บริษัท IKA work ประเทศสหพันธรัฐมาเลเซีย

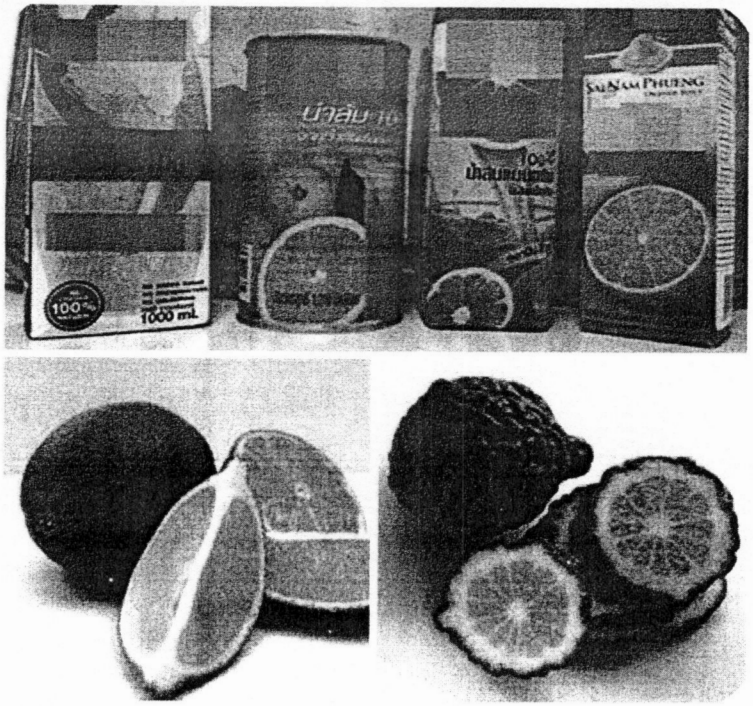
2.2 สารเคมี

1. Aluminium Chloride ($AlCl_3$) บริษัท Merck ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
2. 1,1- Diphenyl-2-picrylhdrazyl (DPPH) บริษัท Fluka, ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
3. Butylated hydroxyl toluene (BHT) บริษัท Aldrich, ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
4. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) บริษัท Fisher Chemicals, ประเทศสหราชอาณาจักร
5. Folin-Ciocalteu's reagent บริษัท CARLO ERBA, ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
6. Gallic acid บริษัท Fluka, ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
7. Hesperidine บริษัท SIGMA, ประเทศสหรัฐอเมริกา

8. Hydrochroric acid (HCL) บริษัท CARLO ERBA ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
9. Methanol บริษัท Merck, ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
10. Sodium Hydroxide (NaOH) บริษัท Merck ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
11. Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) บริษัท Chemikit limited Partnership ประเทศไทย
12. Sodium nitrite ($NaNO_2$) บริษัท APS Finechem ประเทศออสเตรเลีย
13. 100% Mandarin orange juice บริษัท Malee sam pran ประเทศไทย
14. 100% Pomelo juice บริษัท Malee Bangkok ประเทศไทย
15. 100% Sai Nam Phueng orange juice บริษัท TIPCO F&B ประเทศไทย
16. 100% Orange juice บริษัท ไทยอกรีแพค จำกัด ประเทศไทย
17. α-Amylase บริษัท Fluka, ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
18. Pepsin บริษัท Merck, ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี
19. Pancreatin บริษัท BIO BASIC INC, ประเทศแคนาดา
20. Bile extract บริษัท BIO BASIC INC, ประเทศแคนาดา

2.3 น้ำผลไม้

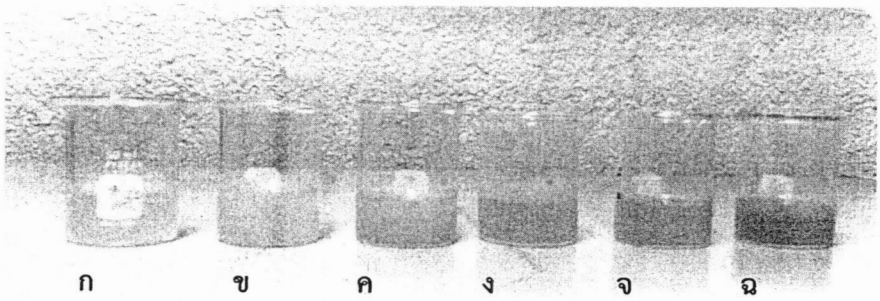
น้ำผลไม้ที่เรานำมาศึกษานำมาจาก 2 แหล่ง คือ น้ำส้มโอ (*Citrus maxima* (Burm.)) น้ำส้มสายน้ำผึ้ง (*Citrus reticulata* Blanco) น้ำส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata*) และน้ำส้มเข้มข้น (ไม่ระบุสายพันธุ์) เป็นน้ำส้มสำเร็จรูปที่ซื้อจากห้างสรรพสินค้าในจังหวัดชลบุรี และ มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swing.) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC) เป็นผลสดที่ซื้อมาจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี (รูปที่ 2-1)



รูปที่ 2-1 ตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ น้ำส้มโอ น้ำส้มเข้มข้น น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มสายน้ำผึ้ง และมะนาว มะกรูด ที่เป็นผลสด

2.4 การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

นำมะนาวและมะกรูดมาคั้นเอาน้ำ จากนั้นกรองน้ำผลไม้แต่ละชนิดด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปกรองต่อด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ โดยใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 และนำตัวอย่างน้ำผลไม้ไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



รูปที่ 2-2 ตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง ก) น้ำส้มโอ ข) น้ำมะนาว ค) น้ำมะกรูด ง) น้ำส้มสายน้ำผึ้ง จ) น้ำส้มแมนดาริน ฉ) น้ำส้มเข้มข้น 100%

2.5 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (รัตติญา บุญใบ, 2552)

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก โดยเตรียมสารละลายกรดแกลลิกในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยปิเปตน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดแกลลิก หรือ น้ำผลไม้ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 125 ไมโครลิตรในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นทำการปิเปตใส่ในหลุมของไมโครเพลทหลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent; GAE) ต่อมิลลิลิตรของน้ำผลไม้ตัวอย่าง คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก คือ $Y = 0.1127x + 0.049$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9982 ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

2.6 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ดัดแปลงจากวิธีของ Rao และคณะ, 2010)

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย hesperidin โดยเตรียมสารละลาย hesperidin ในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยปิเปต hesperidin หรือ น้ำผลไม้ตัวอย่างมา 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 5% โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5-6 นาที แล้วเติม 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกซ์ไซด์ (NaOH) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ปริมาณฟลาโวนอยด์แสดงเป็นมิลลิกรัมสมมูลของ hesperidin (hesperidin equivalent; HE) ต่อมิลลิลิตรของน้ำผลไม้ตัวอย่าง คำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจากสมการของกราฟมาตรฐาน hesperidine equivalent (HE) คือ $Y = 0.0555x + 0.0404$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9934 ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

2.7 การทดสอบ DPPH scavenging activity ตามวิธีของ Brand-Williams, Cuvelier และ Berset (1995)

เตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhdrazyl (DPPH) ในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปิเปตเมทานอลปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในหลุม A ของไมโครเพลท ส่วนหลุม B เติมน้ำผลไม้ความเข้มข้นต่างๆที่ถูกเก็บหลังผ่านการย่อยที่บริเวณ ปาก กระเพาะ และลำไส้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และหลุม C เติมน้ำผลไม้ที่ผ่านการย่อยที่ปาก กระเพาะ และลำไส้ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้บีเอชทีเป็นสารมาตรฐาน ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากสมการ (1)

$$\%\ \text{การกำจัดอนุมูล DPPH} = \frac{[A-(B-C)]}{A}\ x100 \qquad (1)$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ประกอบด้วยเมทานอล และสารละลาย DPPH

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยน้ำผลไม้ตัวอย่าง และสารละลาย DPPH

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยน้ำผลไม้ตัวอย่าง และน้ำกลั่น

2.8 การทดสอบ Superoxide radical scavenging activity ตามวิธีของ Miyazaki และคณะ (2004)

แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เติม 50mM sodium phosphate buffer (pH 8.24) ปริมาตร 2.61 ml เมทานอล 0.3ml และ 3mM pyrogallol ใน 10mM HCl 0.09ml จากนั้นวัด A_{325} กลุ่มที่ 2 เติม 50mM sodium phosphate buffer (pH 8.24) ปริมาตร 2.61 ml สารสกัดพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.3ml และ 3mM pyrogallol ใน 10mM HCl 0.09ml จากนั้นวัด A_{325} กลุ่มที่ 3 เติม sodium phosphate buffer (pH 8.24) ปริมาตร 2.70 ml ส่วนสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.3ml จากนั้นวัด A_{325} หาเปอร์เซ็นต์การกำจัด superoxide radicals จากสมการ [1-((A2 – A3)/A1)] x 100 โดยที่ A1 คือ A_{325} ของกลุ่มที่ 1 A2 คือ A_{325} ของกลุ่มที่ 2 และ A3 คือ A_{325} ของกลุ่มที่ 3

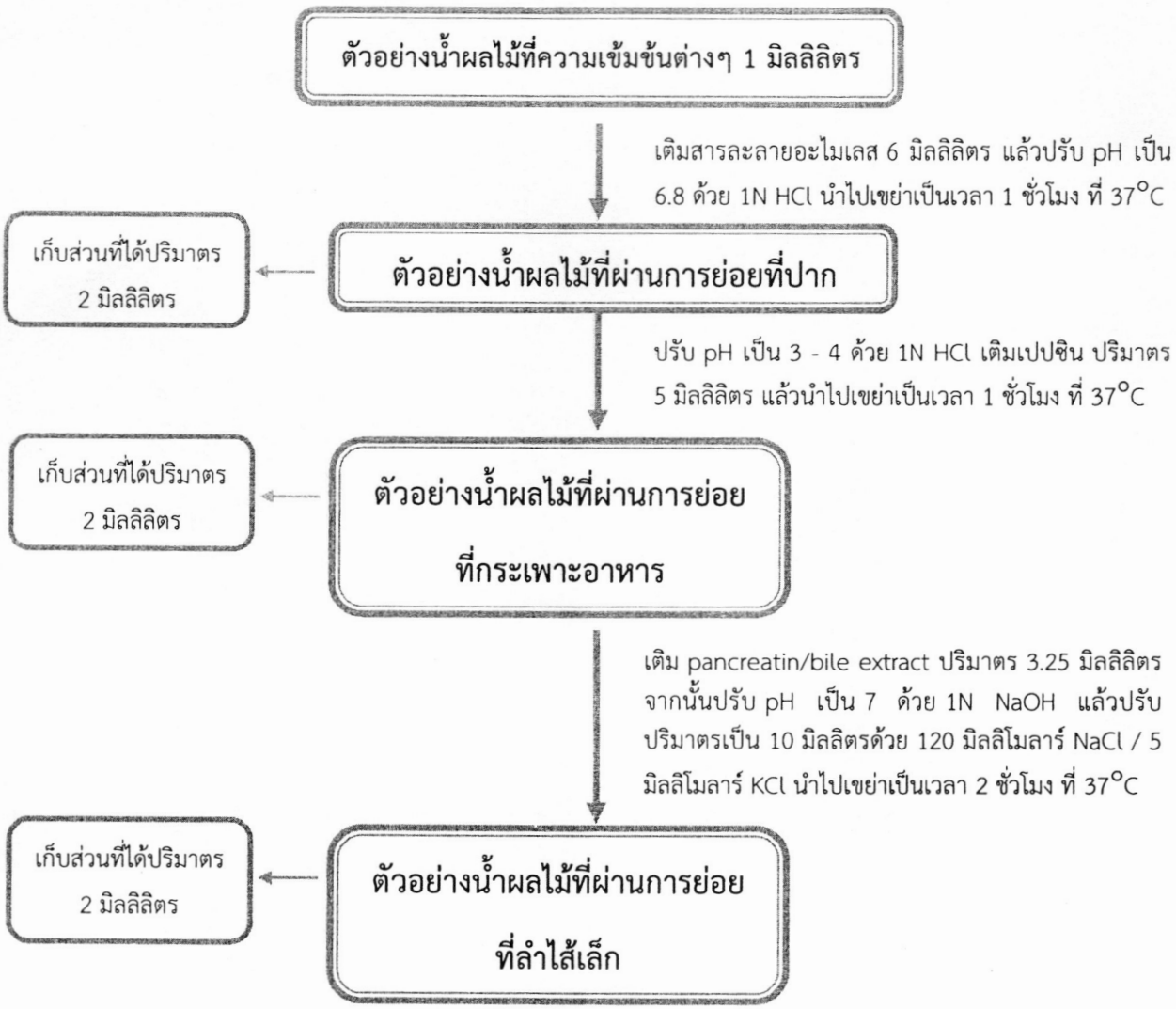
2.9 การทดสอบ FRAP assay ตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996)

เตรียมสารละลาย FRAP reagent (10 mmol/L TPTZ (2,4,6-tripyridy-S-triazine solution 2.5 ml ละลายใน 40 mmol/L HCl + 20 mmol/L $FeCl_3$ 2.5 ml + 0.3 mol/L acetate buffer, pH 3.6 25 ml)

จากนั้นนำไปอุ่นที่ 37^0C จากนั้นแบ่งตัวอย่างมา 40 μL เติมน้ำกลั่น 0.2 ml แล้วเติม FRAP reagent 1.8 ml นำไปบ่มที่ 37^0C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm โดยใช้ 1 mmol/L $FeSO_4$ เป็นสารมาตรฐาน ผลที่ได้แสดงเป็นปริมาณของสารตัวอย่างที่สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+}

2.10 การทำ *in vitro* digestion

โมเดลการย่อยในหลอดทดลอง (*in vitro* digestion) เป็นการเลียบแบบสภาวะการย่อยในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ตั้งแต่ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้ วิธีที่ใช้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Glahn และ Van Campen (1997) และวิธีของ Laurent และคณะ (2007) โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37^0C และเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา เอนไซม์ต่างๆ เช่น pepsin (800–1000 U/mg protein), pancreatin (activity, 4x USP specifications) และ bile extract (glycine และ taurine conjugates ของ hydroxycholic acids and other bile salts) ปรับ pH ให้เท่ากับ 4 ด้วย 1N HCl และ 0.05 มิลลิลิตร pepsin (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร in 0.1N HCl, pH4) ถูกเติมลงไปต่อน้ำส้ม 1 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 60 นาที พร้อมกับเขย่าไปด้วยที่ 55 รอบต่อนาที 37^0C จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6 โดยการเติม 1M $NaHCO_3$ และ 0.25 มิลลิลิตร pancreatin-bile extract solution (2g/l pancreatin และ 12g/l bile extract ใน 0.1M $NaHCO_3$) ถูกเติมต่อน้ำส้ม 1 มิลลิลตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 1N NaOH แล้วเจือจางตัวอย่าง 2:3 ด้วย 120mM NaCl/5mM KCl solution บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 120 นาที พร้อมเขย่าโดยใช้ความเร็ว 6 รอบต่อนาที ที่ 37^0C ซึ่งเราจะเรียกสารที่ได้ในขั้นนี้ว่า “digestate” นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 1200 rpm เป็นเวลา 15 นาที 37^0C ดูดส่วนน้ำ 0.5 มิลลิลตร เติมลงในหลุม (well) เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป หรือเก็บที่ -80^0C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์



รูปที่ 2-3 วิธีการย่อยในหลอดทดลองของน้ำผลไม้ตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก Petchlert, 2009)

2.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

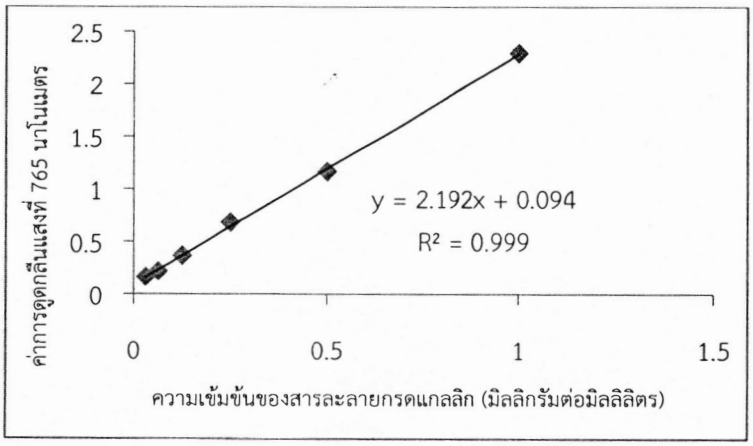
แสดงข้อมูลที่ได้ในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และการทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ คำนวณหา IC_{50} ของการยับยั้งโดยการวิเคราะห์แบบถดถอย ความแตกต่างของชุดข้อมูลถูกวิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA ตามวิธีของ Duncan และ Tukey โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17.0 ที่ $P < 0.05$

บทที่ 3

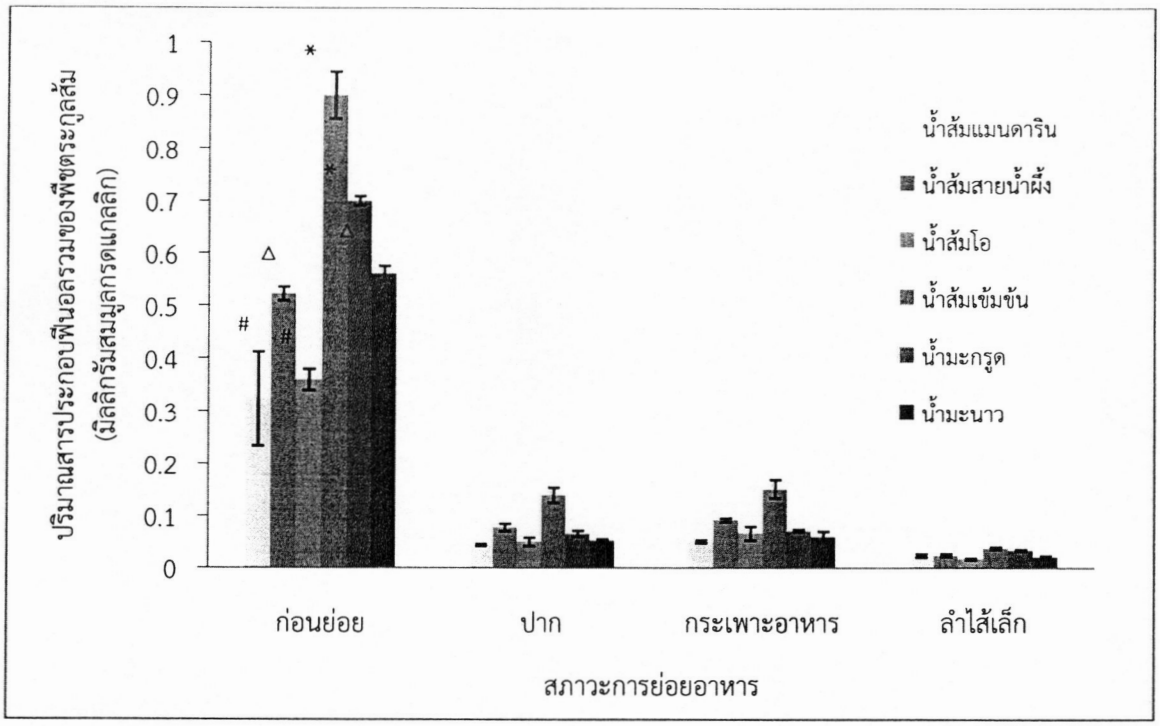
ผลการวิจัย

3.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การหาสารประกอบฟีนอลรวมจากน้ำผลไม้ตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิดโดยใช้ความเข้มข้นที่ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า ก่อนย่อยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมอยู่ในช่วง 0.32±0.09 ถึง 0.90±0.04 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำส้มเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดเท่ากับ 0.90±0.04 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง หลังผ่านการย่อยที่ปากพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมลดลงมาอยู่ในช่วง 0.04±0.00 ถึง 0.14±0.01 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำส้มเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดเท่ากับ 0.14±0.01 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง หลังผ่านการย่อยที่กระเพาะอาหารมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมอยู่ในช่วง 0.05±0.00 ถึง 0.15±0.02 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำส้มเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดเท่ากับ 0.15±0.02 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง และหลังผ่านการย่อยที่ลำไส้เล็กมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมลดลงมาอยู่ในช่วง 0.02±0.00 ถึง 0.04±0.00 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง (รูปที่ 3-2) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของน้ำส้มคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (รูปที่ 3-1) สมการเส้นตรงที่ได้คือ $y = 2.1927x + 0.0948$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9993



รูปที่ 3-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของตัวอย่างน้ำผลไม้ในตระกูลส้ม



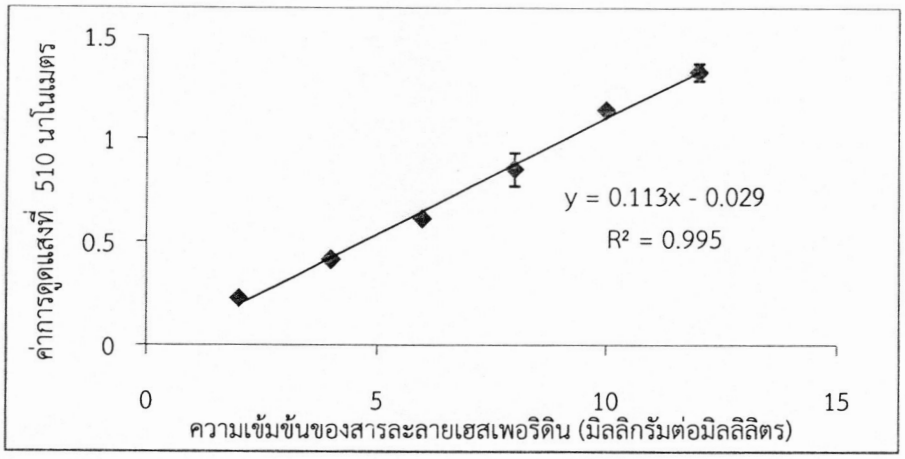
รูปที่ 3-2 ภาพแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเปรียบเทียบก่อนและหลังย่อย

หมายเหตุ *, Δ, #, ● แสดงถึงความแตกต่างของน้ำผลไม้ตัวอย่างแต่ละชนิดในแต่ละสภาวะการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

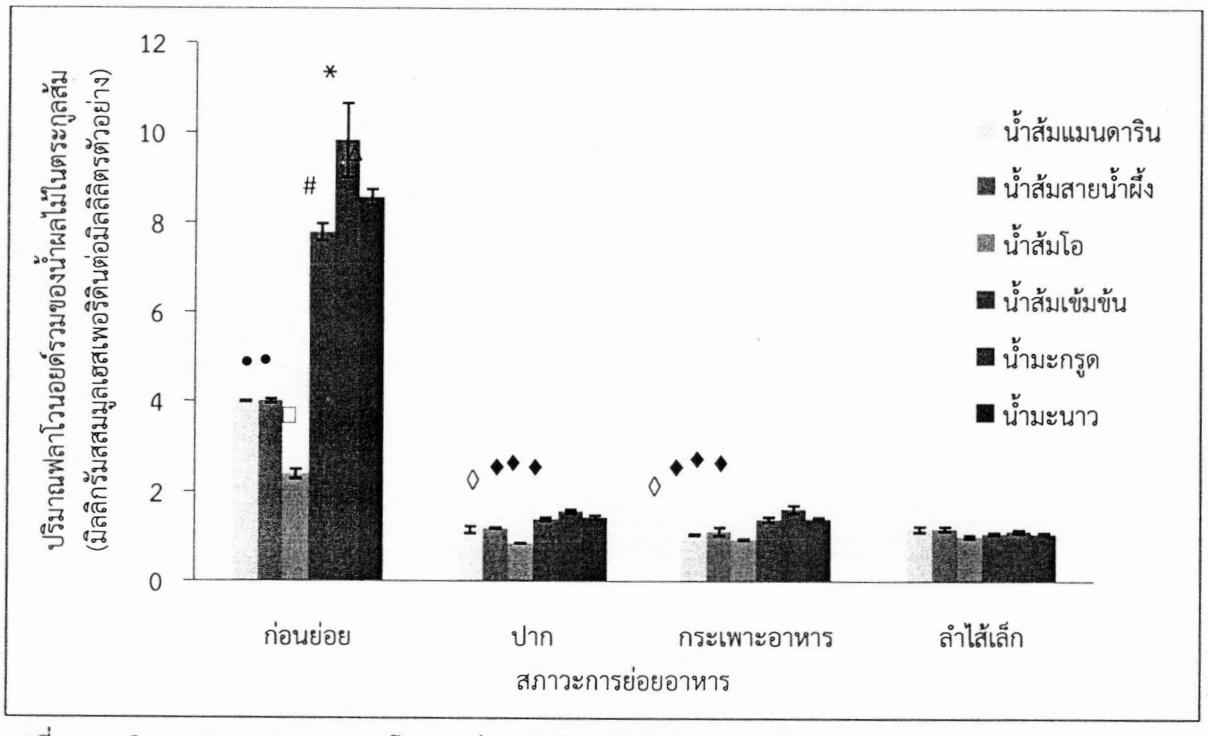
3.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การหาสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจากน้ำผลไม้ตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นที่ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า ก่อนย่อยมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 2.38±0.10 ถึง 9.8±0.82 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำมะกรูดมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเท่ากับ 9.8±0.82 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง หลังผ่านการย่อยที่ปากพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมลดลงมาอยู่ในช่วง 0.86±0.00 ถึง 1.57±0.04 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำมะกรูดมีปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งมีเพียง 1.57±0.04 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง หลังผ่านการย่อยที่กระเพาะอาหารมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 0.95±0.01 ถึง 1.61±0.09 มิลลิกรัมสมมูล เฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำมะกรูดมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งมีเพียงแค่ 1.61±0.09 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง และหลังผ่านการย่อยที่ลำไส้เล็กมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมลดลงมาอยู่ในช่วง 1.01±0.04 ถึง 1.18±0.05 มิลลิกรัมสมมูลเฮสเพอริดินต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง (รูปที่

3-4) การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของน้ำส้มคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายเฮสเพอริดิน (รูปที่ 3-3) สมการเส้นตรงที่ได้คือ y = 0.113x - 0.0296 และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9952



รูปที่ 4-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายเฮสเพอริดินในการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของตัวอย่างน้ำผลไม้ในตระกูลส้ม



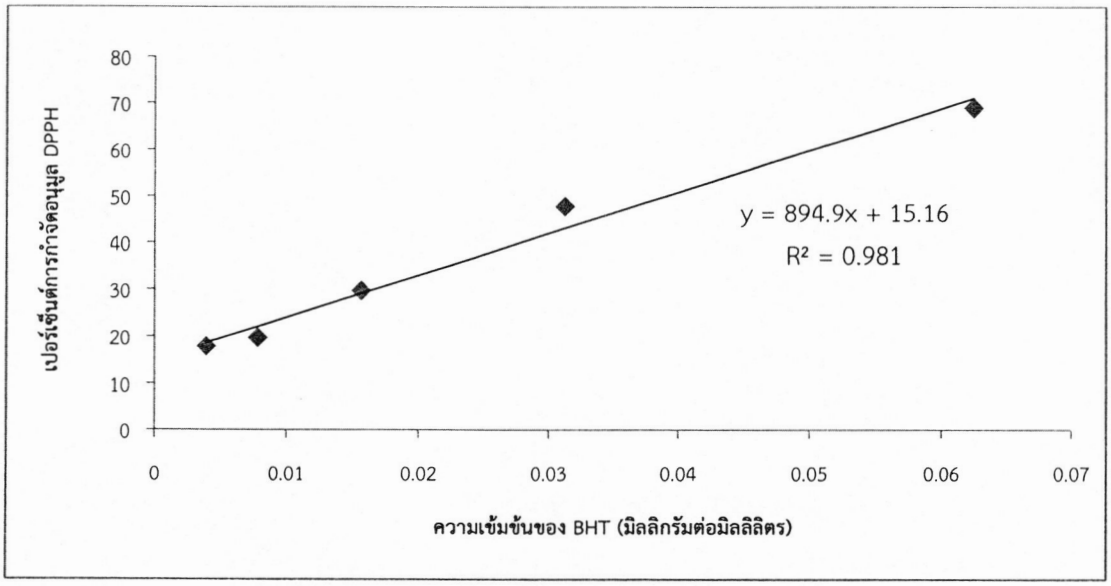
รูปที่ 3-4 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเปรียบเทียบก่อนและหลังย่อย

*, Δ, #, •, □, ♦, ◊ แสดงถึงความแตกต่างของน้ำผลไม้ตัวอย่างแต่ละชนิดในแต่ละสภาวะการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

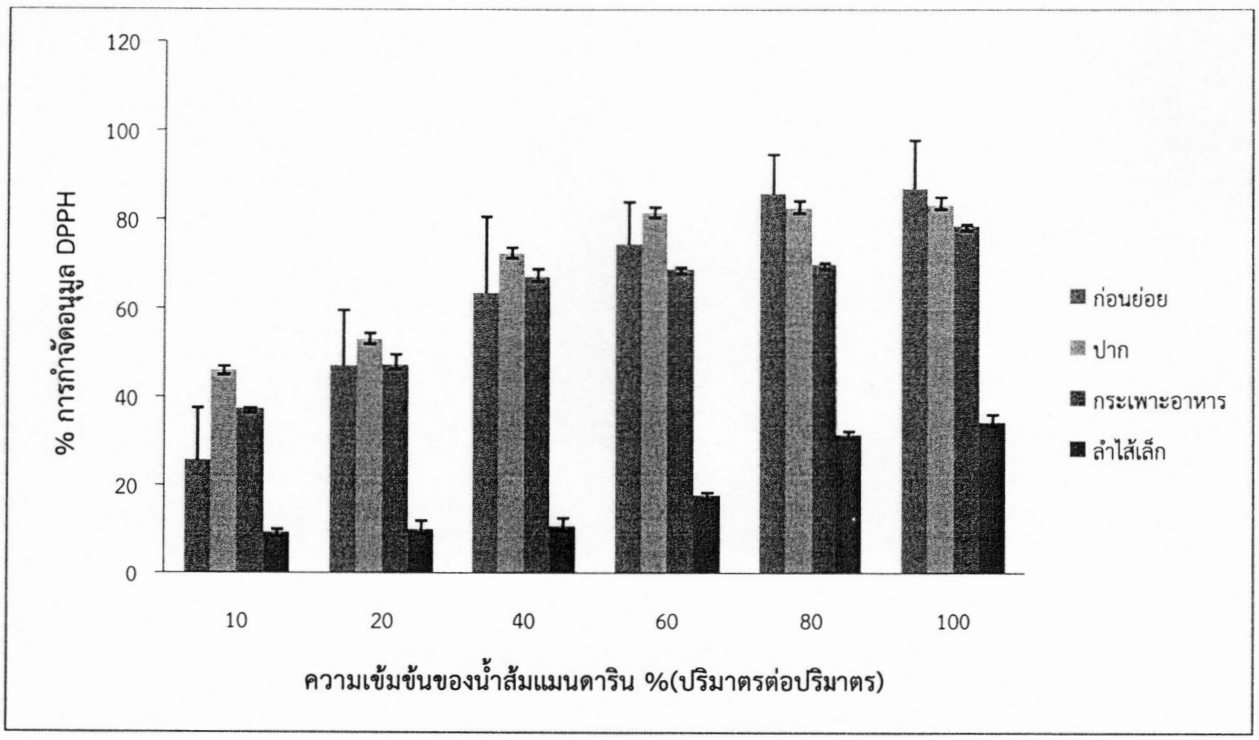
3.3 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำผลไม้แต่ละชนิดก่อนการย่อยอาหารพบว่า น้ำผลไม้ทุกชนิดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และเมื่อหลังผ่านการย่อยอาหารในหลอดทดลองน้ำผลไม้ทุกชนิดก็ยังคงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH เหลืออยู่ โดยความเข้มข้นของน้ำมะกรูด มะนาว ส้มโอ และน้ำส้มเข้มข้นที่ทำการศึกษาจะอยู่

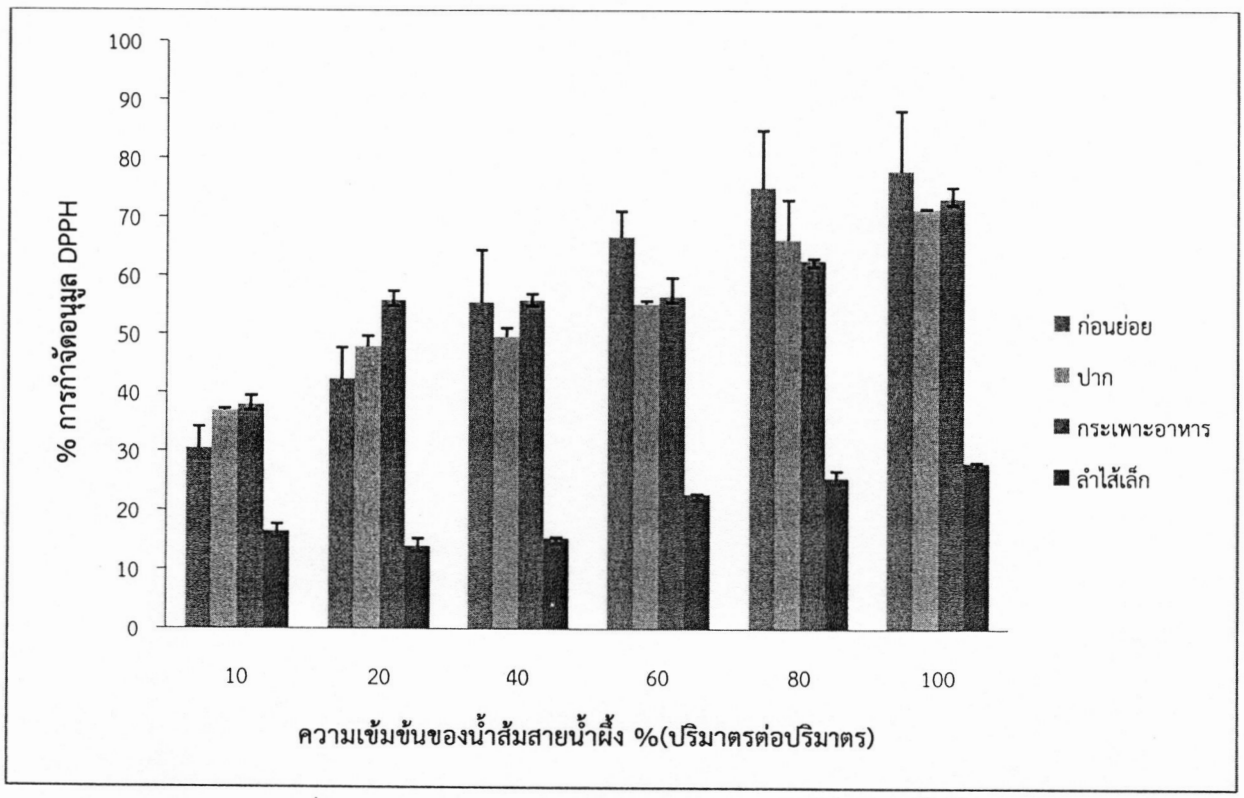
ในช่วง 0.3125 ถึง 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนความเข้มข้นของน้ำส้มแมนดารินและน้ำส้มสายน้ำผึ้งที่ทำการศึกษาจะอยู่ในช่วง 10 ถึง 100 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำผลไม้ตัวอย่างก่อนย่อยอาหารมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น โดยพบว่า น้ำมะกรูดก่อนการย่อยมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด (84.34%) เมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ และเมื่อนำตัวอย่างน้ำผลไม้มาผ่านการย่อยอาหารในปากและกระเพาะอาหารไปแล้วพบว่า ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำผลไม้ตัวอย่างโดยภาพรวมแล้วมีฤทธิ์เพิ่มสูงขึ้นจากก่อนการย่อย แต่เมื่อผ่านการย่อยที่ลำไส้เล็กไปแล้วกลับพบว่า ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH มีทั้งที่เพิ่มขึ้นและลดลง ซึ่งตัวอย่างที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น คือ น้ำมะนาว ขณะที่ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ลดลง ได้แก่ น้ำส้มเข้มข้น น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มสายน้ำผึ้ง น้ำส้มโอ และน้ำมะกรูด โดยน้ำมะนาวมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด (42.93%) เมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ หลังผ่านการย่อย รองลงมาคือ น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มเข้มข้น น้ำส้มสายน้ำผึ้ง น้ำส้มโอและน้ำมะกรูด ตามลำดับ (รูปที่ 3-6 ถึง 3-11)



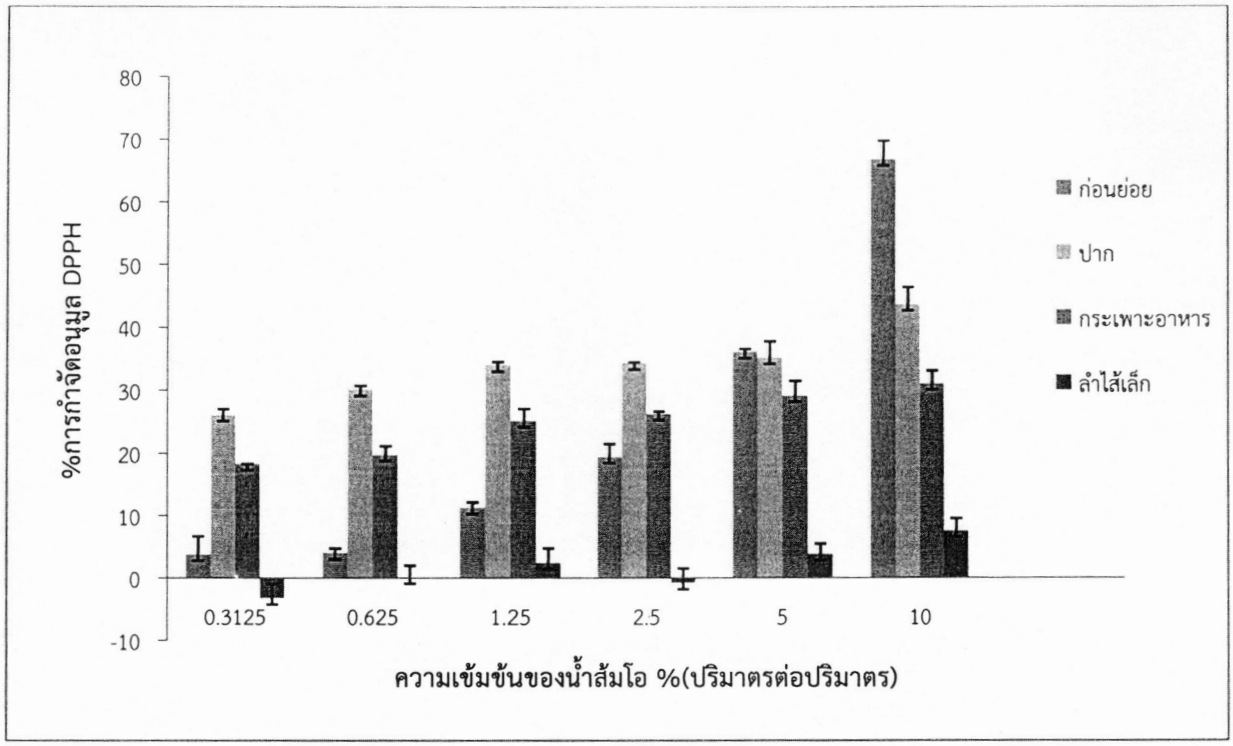
รูปที่ 3-5 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของบีเอชที



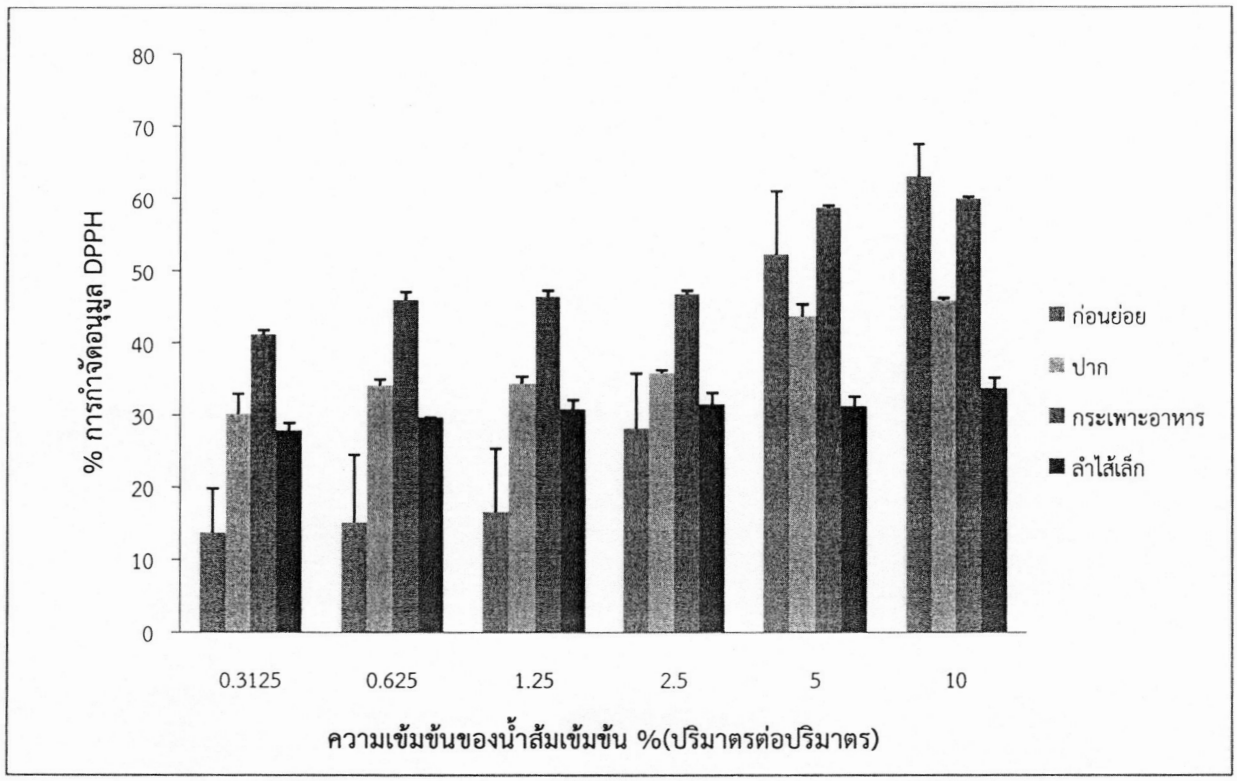
รูปที่ 3-6 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำส้มแมนดาริน



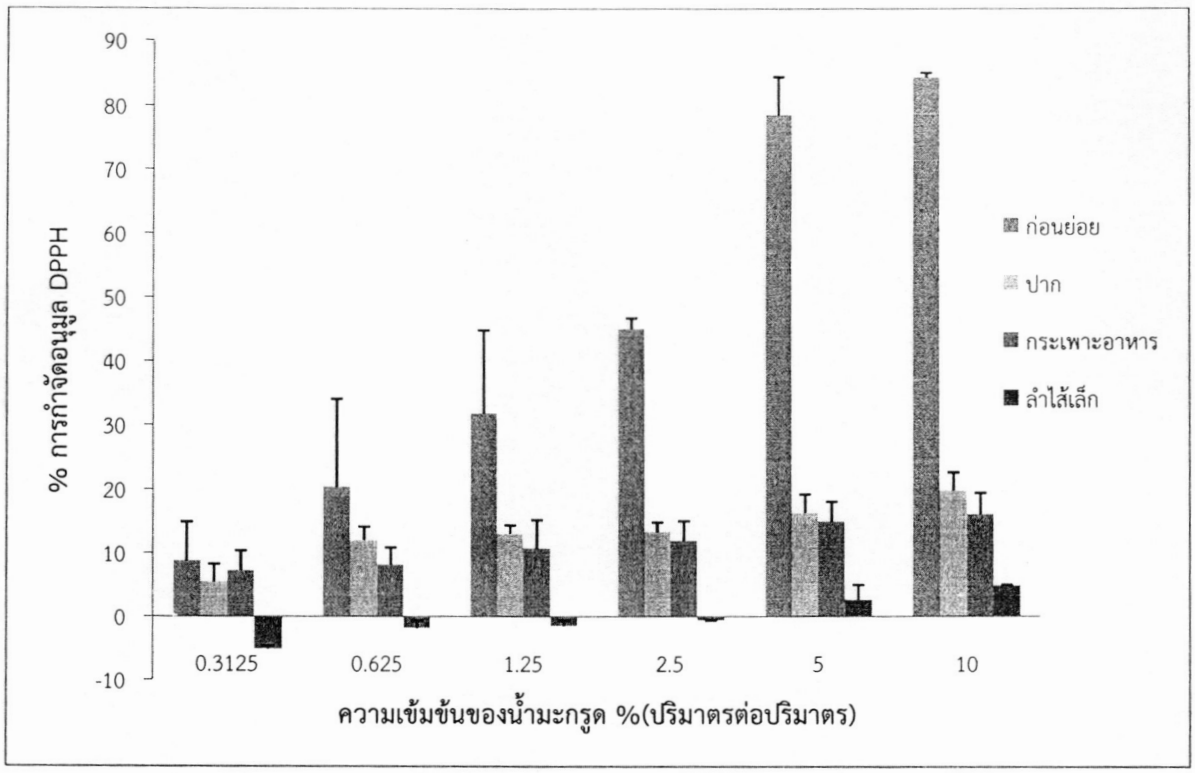
รูปที่ 3-7 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำส้มสายน้ำผึ้ง



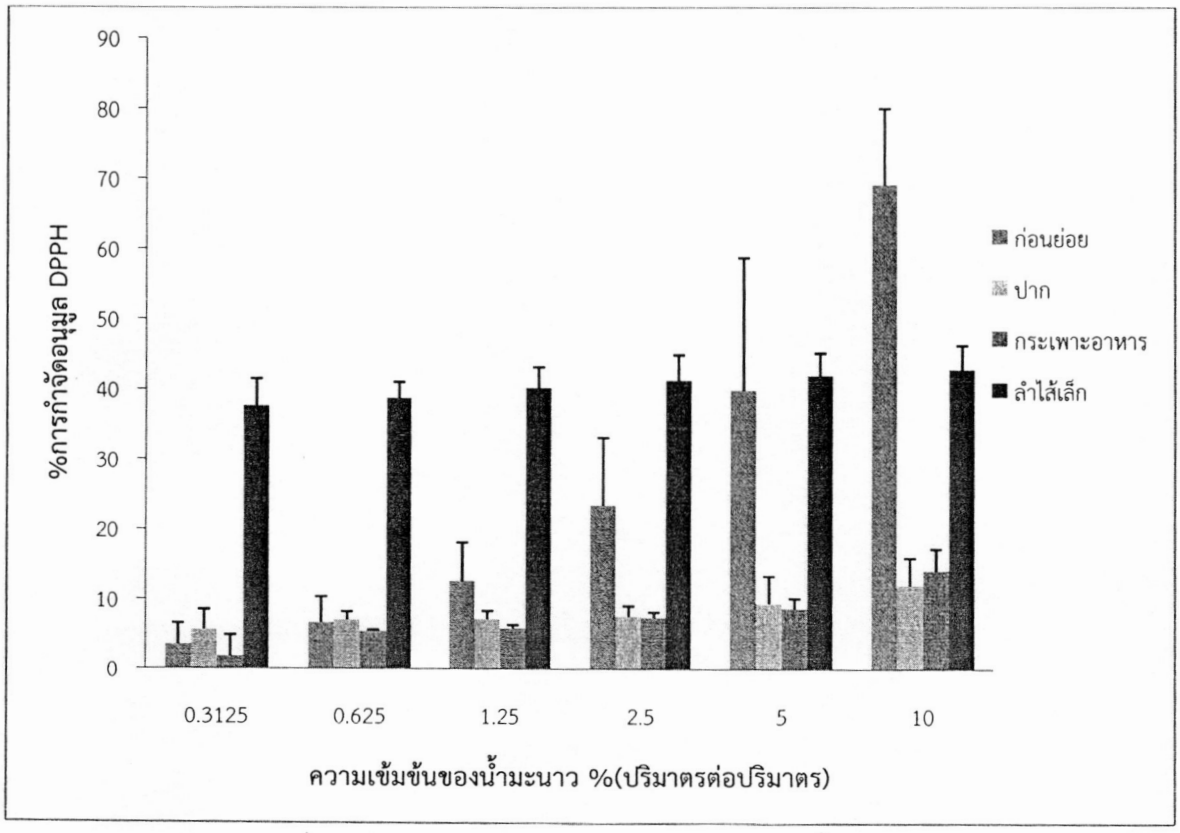
รูปที่ 3-8 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำส้มโอ



รูปที่ 3-9 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำส้มเข้มข้น



รูปที่ 3-10 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำมะกรูด



รูปที่ 3-11 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำมะนาว

3.4 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ของน้ำผลไม้แต่ละชนิด พบว่าน้ำผลไม้ทุกชนิดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยความเข้มข้นของน้ำมะกรูด มะนาว และน้ำส้มเข้มข้นที่ทำการศึกษาจะอยู่ในช่วง 0.3125 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นของน้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มสายน้ำผึ้ง และน้ำส้มโอที่ทำการศึกษาจะอยู่ในช่วง 10 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ของน้ำผลไม้ตัวอย่างมีความสอดคล้องไปในทางเดียวกัน คือ มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยน้ำส้มเข้มข้นจะมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ สูงที่สุด รองลงมา คือ น้ำมะกรูด น้ำมะนาว น้ำส้มโอ น้ำส้มสายน้ำผึ้ง และน้ำส้มแมนดาริน ตามลำดับ (ตารางที่ 3-1 และ 3-2 และรูปที่ 3-12 ถึง 3-14) ซึ่งค่า IC_{50} ของน้ำส้มเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่า IC_{50} ของน้ำมะกรูด น้ำมะนาว น้ำส้มโอ น้ำส้มสายน้ำผึ้ง และน้ำส้มแมนดาริน มีค่าเท่ากับ 1.96, 4.94, 40.27, 57.76 และ 80.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3-3) ในขณะที่สารสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานบีเอชที มีค่า IC_{50} เท่ากับ 323.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3-5 และรูปที่ 3-15)

ตารางที่ 3-1 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของน้ำมะกรูด น้ำมะนาว และน้ำส้มเข้มข้น

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์		
	น้ำมะกรูด	น้ำมะนาว	น้ำส้มเข้มข้น
0.3125	26.47±12.82	ตรวจไม่พบ	56.85±14.36
0.625	37.47±9.99	8.70±11.94	59.12±14.26
1.25	47.93±7.76	16.81±12.15	67.47±13.96
2.5	65.01±4.28	35.88±11.64	76.18±21.38
5	79.33±1.52	62.42±8.99	80.29±20.87
10	97.23±0.14	83.92±4.46	99.70±24.04

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3-2 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มสายน้ำผึ้ง และน้ำส้มโอ

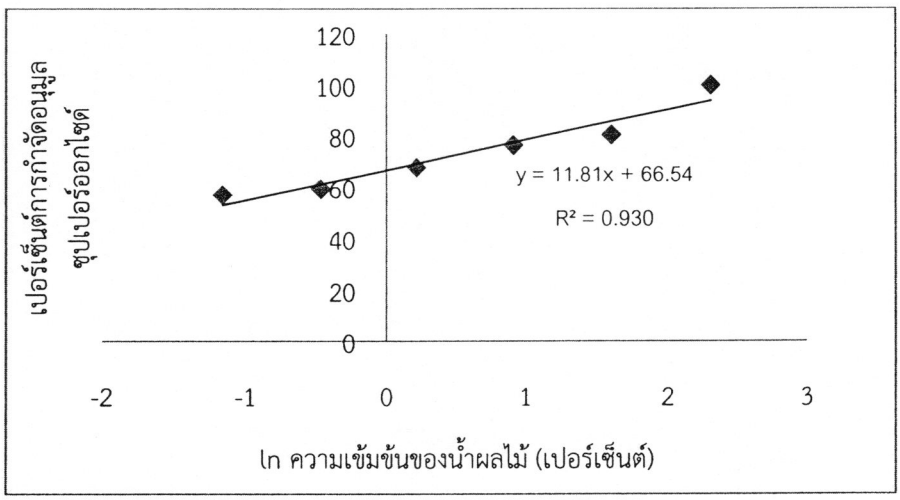
ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์		
	น้ำส้มโอ	น้ำส้มแมนดาริน	น้ำส้มสายน้ำผึ้ง
10	23.60±13.34	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
20	39.23±9.39	ตรวจไม่พบ	14.30±4.18
40	49.50±18.91	21.74±2.02	41.93±3.73
60	68.05±13.10	36.43±0.68	55.18±4.50
80	73.61±12.12	50.43±3.53	67.21±5.25
100	88.53±6.72	62.20±4.22	80.16±3.95

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

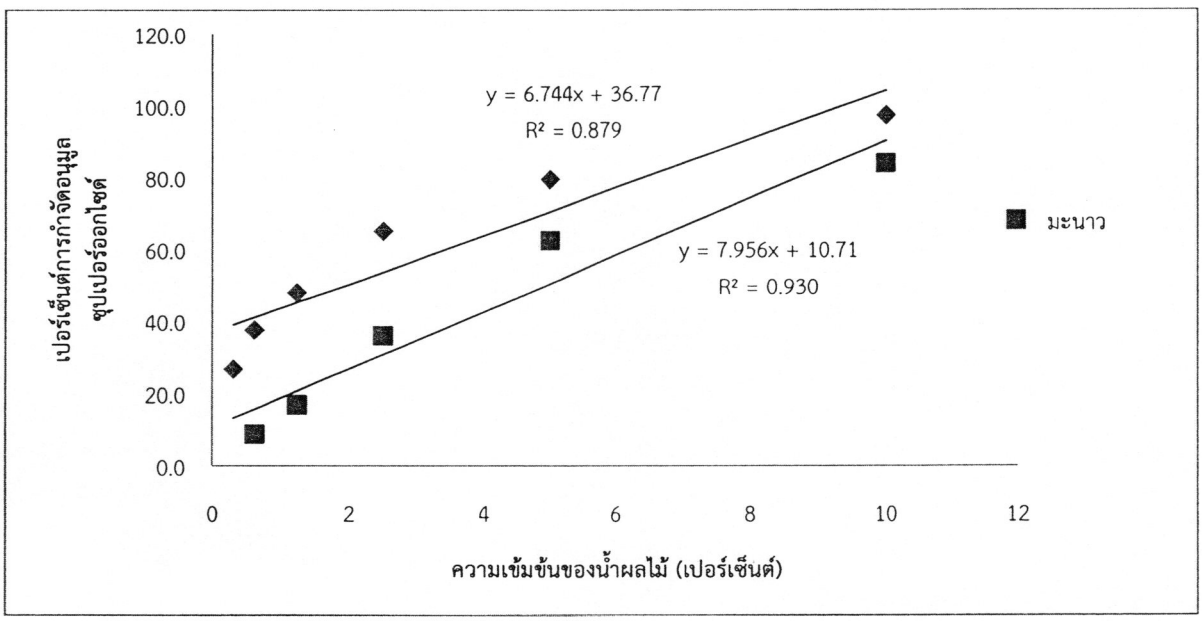
ตารางที่ 3-3 ค่า IC_{50} การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของน้ำผลไม้ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)
น้ำส้มเข้มข้น	0.25±6.41
น้ำมะกรูด	1.96±1.74
น้ำมะนาว	4.94±1.04
น้ำส้มโอ	40.27±12.51
น้ำส้มสายน้ำผึ้ง	57.76±4.77
น้ำส้มแมนดาริน	80.79±8.34

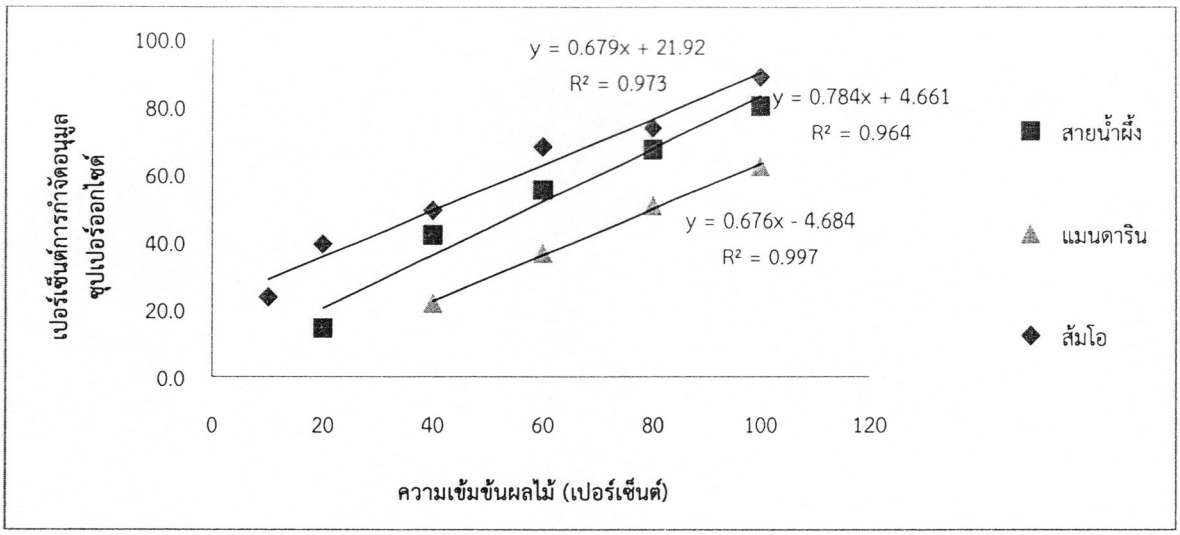
หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3-12 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของน้ำส้มเข้มข้น



รูปที่ 3-13 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของน้ำมะกรูด น้ำมะนาว



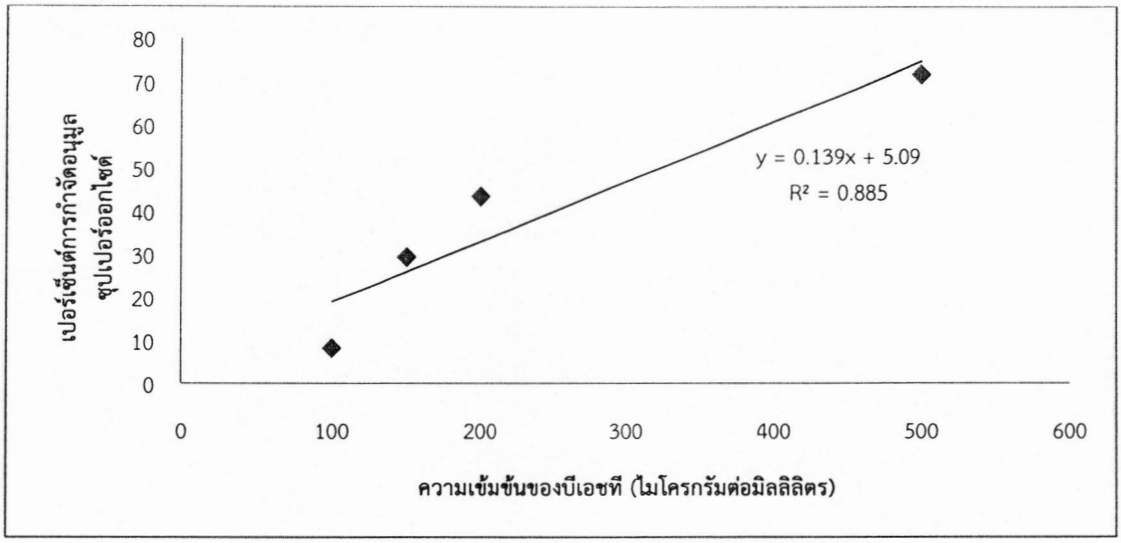
รูปที่ 3-14 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของน้ำส้มโอ น้ำส้มแมนดารินและน้ำส้มสายน้ำผึ้ง

ตารางที่ 3-4 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารละลายบีเอชที

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ บีเอชที
50	ตรวจไม่พบ
100	8.27±2.26
150	29.32±6.97
200	43.39±13.34
500	71.66±5.28

ตารางที่ 3-5 ค่า IC_{50} การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารละลายตัวอย่างบีเอชที

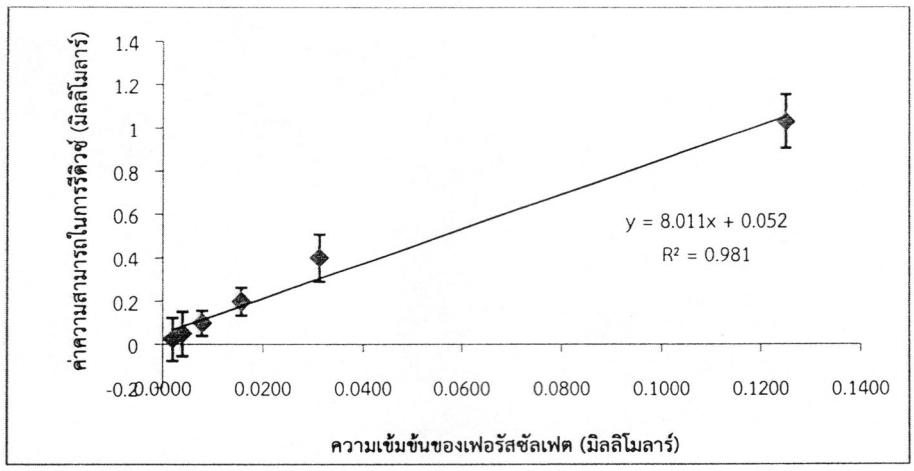
ตัวอย่าง	ค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
บีเอชที	322.63 ± 5.18



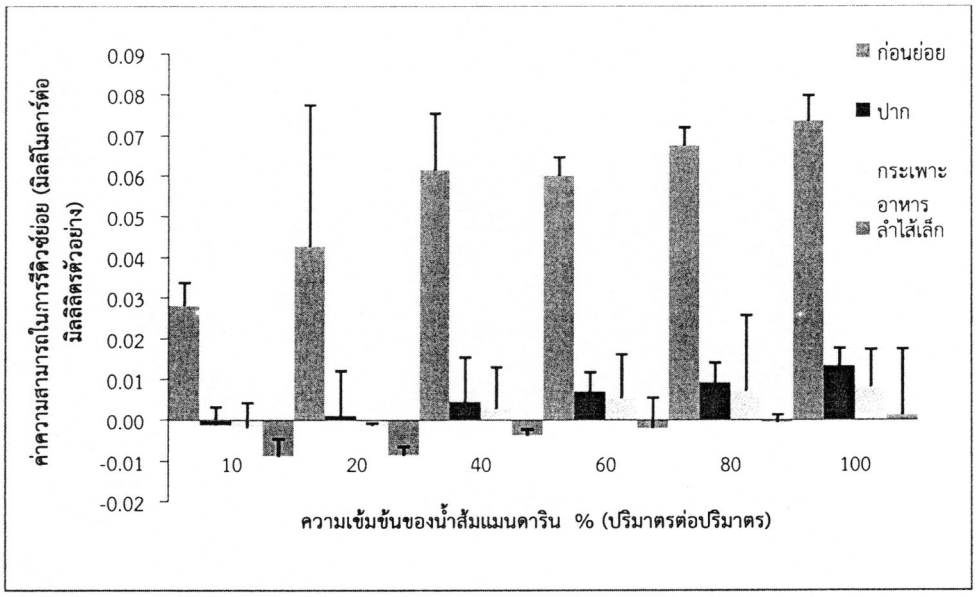
รูปที่ 3-15 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารละลายตัวอย่างบีเอชที

3.5 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์

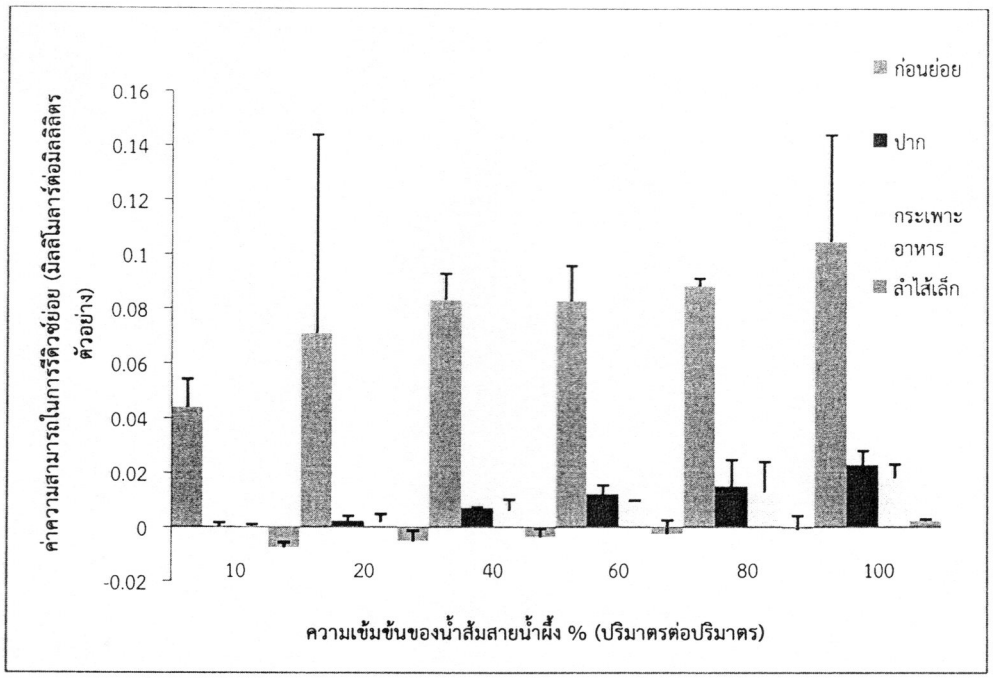
จากการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของตัวอย่างน้ำผลไม้ก่อนย่อยและหลังผ่านการย่อย (รูปที่ 3-17 ถึง 3-22) ใช้ความเข้มข้นของน้ำมะกรูด มะนาว ส้มโอ และน้ำส้มเข้มข้นที่ทำการศึกษาจะอยู่ในช่วง 0.3125%-10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ส่วนความเข้มข้นของน้ำส้มแมนดารินและน้ำส้มสายน้ำผึ้งที่ทำการศึกษาจะอยู่ในช่วง 10 ถึง 100 % (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยพบว่าความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำผลไม้ตัวอย่างก่อนการย่อยมีความสอดคล้องไปในทางเดียวกัน คือ ความสามารถในการรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ซึ่งมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.1046 ถึง 0.0091 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง แต่เมื่อผ่านการย่อยอาหารในแต่ละสภาวะแล้วกลับพบว่าความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำผลไม้ตัวอย่างลดลงอย่างเห็นได้ชัดมากถึง 90 ถึง 95% โดยน้ำส้มสายน้ำผึ้งที่ความเข้มข้น 10 % (ปริมาตร/ปริมาตร) หลังผ่านการย่อยที่ลำไส้เล็กพบว่า มีค่า FRAP value สูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆซึ่งมีเพียง 0.0022±0.00 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง รองลงมาคือ น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มเข้มข้น น้ำมะนาว น้ำส้มโอ และน้ำมะกรูด ที่ความเข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งมีค่า FRAP value ที่เมื่อผ่านการย่อยที่ลำไส้เล็กแล้วเหลืออยู่เพียง 0.0013, -0.0042, -0.0051, -0.0054 และ-0.0061 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการรีดิวซ์ของตัวอย่างสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (รูปที่ 3-16) โดยสมการเส้นตรงที่ได้ คือ $y = 8.011x + 0.052$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.981



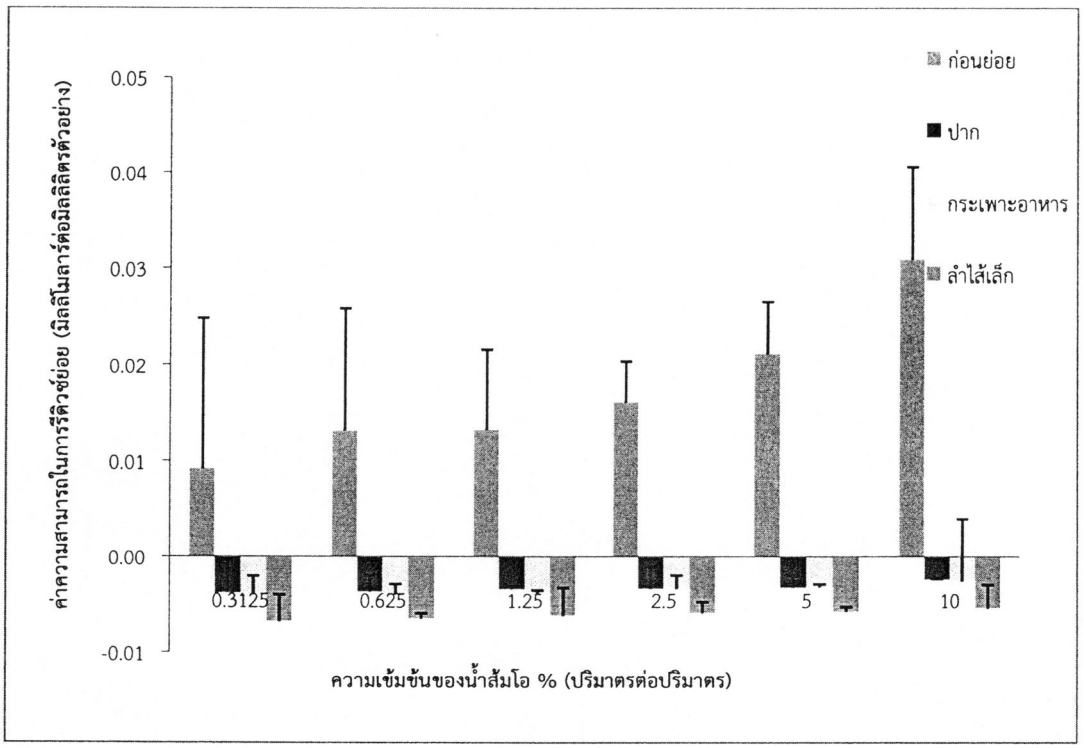
รูปที่ 3-16 กราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตที่ใช้ในการหาความสามารถในการรีดิวซ์



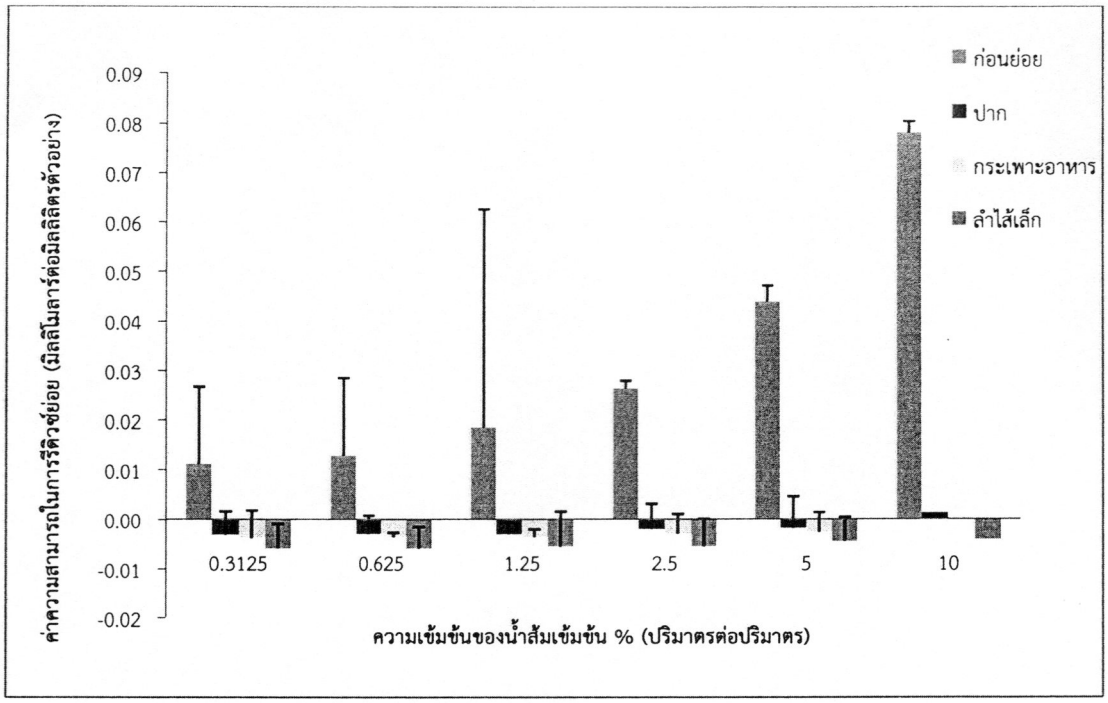
รูปที่ 3-17 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำส้มแมนดาริน



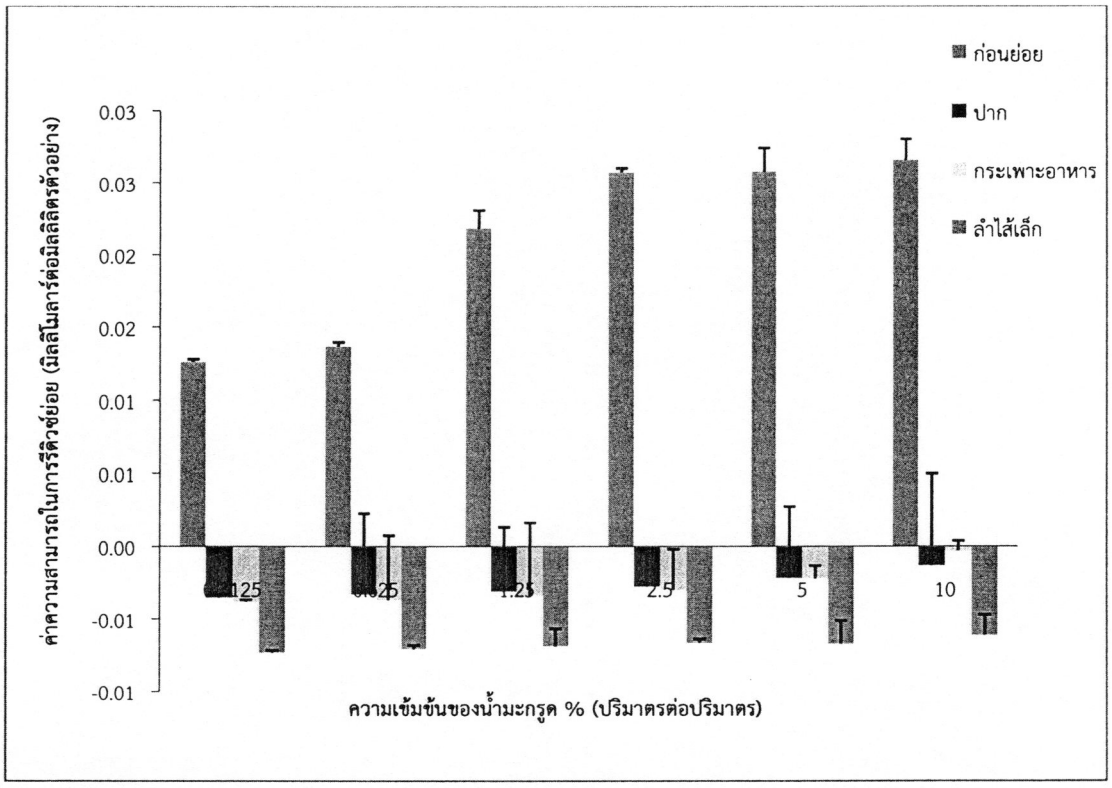
รูปที่ 3-18 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำส้มสายน้ำผึ้ง



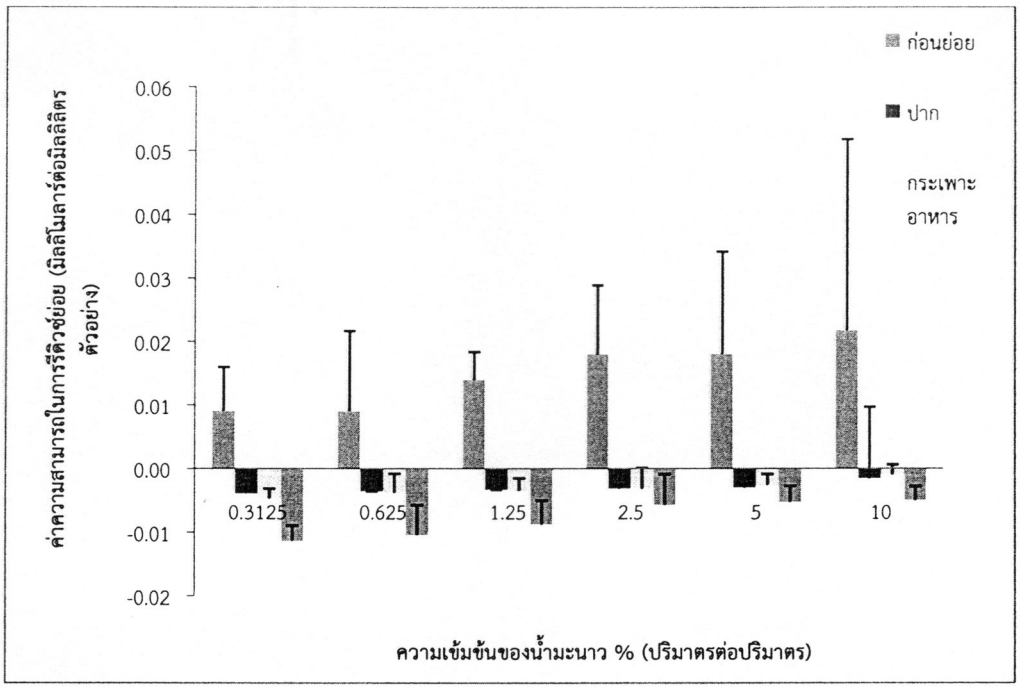
รูปที่ 3-19 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำส้มโอ



รูปที่ 3-20 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำส้มเข้มข้น



รูปที่ 3-21 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำมะกรูด



รูปที่ 3-22 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำมะนาว

บทที่ 4

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ได้นำน้ำผลไม้ตระกูลส้มสำเร็จรูปที่ซื้อจากห้างสรรพสินค้าในจังหวัดชลบุรีมา 4 ชนิดคือ น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มสายน้ำผึ้ง น้ำส้มเข้มข้น น้ำส้มโอ และน้ำผลไม้สดอีก 2 ชนิดคือ มะกรูด มะนาว จากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี นำมาทำการคั้นน้ำโดยไม่ปอกเลือก แล้วนำตัวอย่างทั้ง 6 ชนิดมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งก่อนและหลังย่อยในหลอดทดลอง โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ผ่านการย่อยที่เลียนแบบสภาวะของปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก มาตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม แล้วจึงทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี คือ การกำจัดอนุมูล DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์ และทำ พบว่าตัวอย่างน้ำผลไม้ทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดสอบก่อนผ่านการย่อยนั้นทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ แต่เมื่อผ่านการย่อยที่ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก พบว่ายังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหลืออยู่ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ

สารประกอบฟีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงอะโรมาติก (Aromatic ring) แทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล โดยมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอม ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550) สารประกอบฟีนอลิกมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระได้หลายลักษณะ ได้แก่ สามารถกำจัด reactive species ต่างๆ โดยตรง เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไนโตรเจนออกไซด์ สามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยกำจัดอนุมูลเพอร์รอกซี (Chain-breaking peroxyl radical scavenger) และ สารประกอบฟีนอลิกสามารถ คีเลตไอออนของโลหะที่เป็นตัวการสำคัญของการเร่งปฏิกิริยาเฟนตันและปฏิกิริยาฮาเบอร์ไวส์ ในการสร้างอนุมูลตัวอื่นๆ (Halliwell and Gutteridge, 2007)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มใหญ่ในสารประกอบฟีนอลที่พบได้ทั่วไปในทุกส่วนของพืช ซึ่งเฮสเพอริดินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในผลไม้ตระกูลส้ม ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในเยื่อและเปลือกจึงถูกนำมาใช้เป็นสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของตัวอย่างน้ำผลไม้ทั้ง 6 ชนิด (เรไร แก้วน้อย และอทิตยาภรณ์ ศิริบุตร, 2554)

จากผลการทดลองพบว่าน้ำผลไม้ในตระกูลส้มหลังผ่านการย่อยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ลดลง ซึ่งอาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ pH อุณหภูมิ และ จากการทำปฏิกิริยาของ

เอนไซม์ต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารเป็นผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์หลังการย่อยลดลง (Tagliazucchi et al., 2009) ความร้อนจากกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ อาจมีส่วนทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอล และสารประกอบฟลาโวนอยด์ลดลง (Agcam, Akyildiz and Akdemir, 2014) และจากงานวิจัย Soto, Barbera´n and Conesa (2007) พบว่าสารโพลีฟีนอลมีความไวต่อสภาวะความเป็นด่างสูง ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าสภาวะความเป็นด่างในลำไส้เล็กอาจส่งผลให้โครงสร้างทางเคมีของสารโพลีฟีนอลเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นชาลโคน (chalcone) ซึ่งโครงสร้างนี้ใสไม่มีสี ทำให้ในการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีในน้ำผลไม้ตระกูลส้มด้วยวิธีเหล่านี้ตรวจวัดปริมาณของสารประกอบได้น้อยลง

จากผลการทดสอบหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีปริมาณลดลง ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบต่อเพื่อดูผลของการย่อยอาหารต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำผลไม้ เนื่องจากสารในกลุ่มโพลีฟีนอลนั้นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้ผลดังต่อไปนี้

ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำผลไม้ตัวอย่างแปรผันตรงกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบทั้งก่อนและหลังการย่อย ตัวอย่างน้ำผลไม้ก่อนการย่อยอาหารเมื่อนำมาทำการทดสอบพบว่า น้ำมะกรูดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุด รองลงมา คือ น้ำมะนาว น้ำส้มโอ น้ำส้มเข้มข้น น้ำส้มแมนดาริน และน้ำส้มสายน้ำผึ้ง เนื่องจากลักษณะของน้ำมะกรูดและน้ำมะนาวเป็นน้ำผลไม้ที่คั้นมาจากผลสดจึงทำให้มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงกว่าน้ำผลไม้ตัวอย่างชนิดอื่น เพราะอุดมไปด้วย ลิโมนอยด์ วิตามินซี โฟเลต และสารประกอบฟีนอลที่ไม่ได้ถูกทำลายไปในขั้นตอนการผลิตเพื่อถนอมอาหารเหมือนตัวอย่างน้ำผลไม้สำเร็จรูป (Beh et al., 2012) เมื่อนำน้ำผลไม้ตัวอย่างไปผ่านการย่อยอาหารทั้ง 3 สภาวะแล้วพบว่าเมื่อนำมาทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างก่อนย่อย น้ำผลไม้ตัวอย่างมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ลดลงหลังย่อย ได้แก่ น้ำมะกรูด น้ำส้มโอ น้ำส้มแมนดาริน น้ำส้มสายน้ำผึ้ง และน้ำส้มเข้มข้น และกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้นหลังย่อย ได้แก่ น้ำมะนาว น้ำผลไม้ตัวอย่างในกลุ่มแรกมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ลดลง 30 ถึง 40% และในกลุ่มที่ 2 มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น 60% โดยตัวอย่างน้ำผลไม้ที่มีฤทธิ์หลังผ่านการย่อยมากที่สุดคือ น้ำมะนาว (42.93%) เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าน้ำมะนาวที่คั้นสดนั้นอุดมไปด้วยวิตามินซี และสารประกอบฟีนอลซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Hoyle and Santos, 2010) ที่ดีกว่าน้ำมะนาวที่ผ่านการพลาสเจอไรส์ที่มีขายตามท้องตลาด (Tomczak, 2007) ในขณะที่ตัวอย่างน้ำผลไม้ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลเมื่อผ่านการย่อยที่ปากแล้วพบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นเป็นผลมาจากไอโซฟลาโวน (Isoflavones) ที่มีในน้ำผลไม้ซึ่งจะอยู่ในรูปสารประกอบไกลโค

ไซด์ถูกเปลี่ยนไปเป็นอะไกลโคน เพื่อให้ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (นุตติยา วีระวัธนชัย และ ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์. 2554) และเมื่อผ่านการย่อยที่กระเพาะอาหารพบว่าสภาพความเป็นกรดของการย่อยอาหารในช่วงกระเพาะทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น (Tarko et al., 2009) แต่กลับลดลงเมื่อผ่านการย่อยที่สภาวะลำไส้เล็กมีการศึกษาของ Soto, Barbera´n and Conesa (2007) พบว่าความคงตัวของสารประกอบโพลีฟีนอลใน chokeberry (*Aronia melanocarpa*) เมื่อผ่านกระบวนการในการจำลองการย่อยสภาวะที่ลำไส้เล็กโดยตรวจวัดปริมาณของ total recovered phenolics หลังจากผ่านกระบวนการย่อยที่ลำไส้แล้ว พบว่าส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านกระบวนการกระบวนการย่อยที่ลำไส้เล็กอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่า dietary polyphenols มีความไวสูงต่อภาวะด่างอ่อนๆในลำไส้เล็กและสัดส่วนของสารประกอบเหล่านี้สามารถเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบโครงสร้างใหม่ที่มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมี และผลต่อเนื่องต่อการนำไปใช้ได้ทางชีวภาพ และฤทธิ์ทางชีววิทยา (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, 2554) ส่วนในตัวอย่างน้ำผลไม้ที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการใช้ความร้อนในการพาสเจอร์ไรส์ส่งผลให้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระมีความคงทนต่อ pH ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการย่อยในสภาวะลำไส้มากกว่าตัวอย่างน้ำผลไม้ชนิดอื่น (Casals and Zevallos, 2004) เป็นผลทำให้น้ำผลไม้บางชนิดมีฤทธิ์เพิ่มสูงขึ้น

เนื่องจากอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลที่เป็นผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่างๆ ของเซลล์เกิดขึ้นตลอดเวลาในร่างกาย นอกจากนี้ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ รังสียูวี ควันบุหรี่ ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการก่อตัวของอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์จัดเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูง ที่มีความว่องไว สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้าง และยังส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย (Halliwell, 1999) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์จากตัวอย่างน้ำผลไม้ตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ในปฏิกิริยา pyrogallol จะเปลี่ยนเป็น pupurogallin จากการออกซิไดซ์โดยอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ pupurogallin เป็นสารที่มีสีส้มอ่อน สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 325 นาโนเมตร การกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ มีผลทำให้หยุดปฏิกิริยา pyrogallol ไปเป็น pupurogallin (Tagliazucchi, 2009) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่นำมาทดสอบ พบว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ดีที่สุด คือ น้ำส้มเข้มข้นซึ่งมีค่า IC_{50} = 0.25 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร อย่างไรก็ตามตัวอย่างทุกชนิดที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ต่ำกว่าสารเปรียบเทียบบีเอชที ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 322.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบ

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value < 0.05

จากผลการทดลองความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric reducing antioxidant power assay) จากการทดลองนี้พบว่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ตระกูลส้มก่อนการย่อยมีความสามารถในการรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น แต่เมื่อผ่านการย่อยทั้งในสภาวะของปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กแล้วความสามารถในการรีดิวซ์กลับลดลง 70-90% เมื่อเทียบกับก่อนการย่อย ตัวอย่างน้ำผลไม้ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดหลังผ่านการย่อย คือ น้ำส้มเข้มข้น ที่ยังมีค่าเพียง 0.0828 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง การลดลงของความสามารถในการรีดิวซ์เกิดจากเมื่อสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผลไม้ผ่านการย่อยในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ต่างๆ อาจไปเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างให้แตกต่างไปจากเดิม ทำให้โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำผลไม้มีคุณสมบัติทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป (Bhatt and Patel, 2013)

ถึงแม้ว่าจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการย่อยอาหารมีผลทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ตัวอย่างลดลง อย่างไรก็ตามน้ำผลไม้เหล่านี้ก็ยังคงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระคงเหลืออยู่บ้าง จึงกล่าวได้ว่าน้ำผลไม้เหล่านี้มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคเพราะมีองค์ประกอบของโพลีฟีนอล กลุ่มฟลาโวนอยด์และกรดฟีนอลิก ถึงแม้ว่าโพลีฟีนอลไม่จัดเป็นสารอาหารตามหลักโภชนาการเนื่องจากไม่ให้พลังงานโดยตรงหรือไม่เป็นสารช่วยให้เกิดพลังงานเหมือนวิตามินและแร่ธาตุ แต่สารดังกล่าวมีบทบาทในการส่งเสริมสุขภาพด้านต่างๆ เมื่อรับประทานในปริมาณที่พอเหมาะและเป็นประจำ

4.2 สรุปผลการวิจัย

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการทดลองคือ สารประกอบฟีนอล และสารประกอบฟลาโวนอยด์มีปริมาณลดลง เป็นเพราะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ pH อุณหภูมิ และ เอนไซม์ต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร ความร้อนจากกระบวนการพาสเจอไรส์ และจากสภาวะความเป็นด่างในลำไส้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี ทำให้ปริมาณของสารประกอบเหล่านี้ลดลง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างน้ำผลไม้ในตระกูลส้มมีทั้งที่ลดลงและเพิ่มขึ้นแตกต่างกันไปตามชนิดของน้ำผลไม้ ตัวอย่างที่ลดลงเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลง pH เปลี่ยนไปที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างซึ่งมีผลทำให้ฤทธิ์ลดลง และในตัวอย่างน้ำผลไม้ที่เพิ่มขึ้นอาจมาจากตัวอย่างมีความทนทานต่อสภาวะความเป็นด่างได้ดีกว่าในตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ลดลง

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ 2556A10802019

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายพันธุ์ต่างๆ หลังผ่านกระบวนการย่อยในหลอดทดลอง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 14 พฤศจิกายน 2555 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2557

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2555 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2556

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	40,000.00	40,000.00	80,000.00	80,000.00	0.00
2. ค่าจ้าง	65,250.00	31,050.00	96,300.00	96,300.00	0.00
3. ค่าวัสดุ	14,224.59	295,162.82	309,387.41	308,660.00	-727.41
4. ค่าใช้สอย	2,000.00	93,431.00	95,431.00	95,000.00	-431.00
5. ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	-	64,440.00	64,440.00	64,440.00	0.00
รวม	121,474.59	**524,083.82**	**645,558.41**	**644,400.00**	**-1,158.41**

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	322,200.00 บาท	เมื่อ 14 พฤศจิกายน 2555
งวดที่ 2	257,760.00 บาท	เมื่อ 26 สิงหาคม 2556
รวม	**579,960.00 บาท**	

.....

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....

เจ้าหน้าที่การเงินโครงงานวิจัย

บรรณานุกรม

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 : 229-276.

ชลธิดา เทพหินลัพ และ นิตติยา สุวรรณสม. (2555). ตำราคู่มือการประชุมปฏิบัติการเรื่องเทคนิคในการตรวจวัดอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระและดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน. พิมพ์ครั้งที่ 1 บริษัท นพบุรีการพิมพ์ จำกัด : เชียงใหม่.

ธีรพงษ์ เทพกรณ์ และ เสาวภา ไชยวงศ์. (2552). การประเมินสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส้มโอพันธุ์ทองดีในประเทศไทยเพื่อการส่งออก. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 35 : มหาวิทยาลัยบูรพา.

นุตติยา วีระวัธนชัย และ ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของฟลาโวนอยด์จากกระดังงาจีน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 : 23-29.

เพชรรุ่ง เทพทอง, จิตพิสุทธิ์ จันทร์ทองอ่อน, อรมณี ประจวบจินดา, ศรีโสภา เรืองหนู, อรุณพร อิฐรัตน์. (2555). การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดชั้นเอทานอลของ ขิง พริกไทยดำและดีปลี. การประชุมเครือข่ายวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 1 : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

มณฑนา วีระวัฒนากร. (2556). ปฏิกิริยาเคมีระหว่างโปรตีนและพอลีฟีนอลและผลต่อระบบชีวภาพของปฏิกิริยา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 18 : 210-218.

มนตรี แสนสุข. (2553). มะนาว มะกรูด จี๊ดจ๊าด. สำนักพิมพ์ ปราชญ์. บริษัท แอล.ที.เพรส จำกัด กรุงเทพมหานคร.

เรไร แก้วน้อย และ อทิตยาภรณ์ ศิริบุตร. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ในพืชตระกูลส้มบางชนิด. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

รัตติญา บุญใบ. 2552. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากใบขลู่. ปริญญานิพนธ์. วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

อภิชาติ ศรีสอาด, บรรณาธิการ. (2545). สวนส้ม. พิมพ์ครั้งที่ 3. บริษัท นาคา อินเตอร์มีเดีย จำกัด กรุงเทพมหานคร.

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544. การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อาทิตยา อินทรีย์ และ สมพิศ แสดขุนทด. 2553. ผลของการย่อยในหลอดทดลองต่อฤทธิ์ในการต้านนอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบชะมวง. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พริ้นท์. 190 หน้า.

โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ.พิมพ์ครั้งที่ 2. นิวไทยมิตรการพิมพ์: กรุงเทพมหานคร.

Agcam E, Akyildiz A, Akdemir EG. (2014). Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurisation. Food Chemistry. 143 : 354-61.

Beh Lk, Zakaria Z, Beh BK, Ho YW, Yeap SK, Alitheen NBM. (2012). Comparison of total phenolic content and antioxidant activities of freeze-dried commercial and fresh fruit juices. Journal of Medicinal Plants Research. 48 : 5857-5862.

Bhatt A, Patel V. (2013). Antioxidant activity of garlic using conventional extraction and in vitro gastrointestinal digestion. Free Radicals and Antioxidants 3 : 30-34.

Casals BAC, Zevallos LC. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 86 : 69–77.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (2007). Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Clarendon, Oxford.

Hoyle CHV, Santos JH. (2010). Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia. International Food Research Journal. 17 : 937-946.

Hur SJ, Park SJ, Jeong CH. (2011). Effect of buckwheat extract on the antioxidant activity of lipid in mouse brain and its structural change during in vitro human digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59 : 10699-10704.

Izquierdo GA, Gil MI, Ferreres F, Barberan TFA. (2001) In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49 : 1035-1041.

Klimczak I, Maiecka M, Szlachta M, Swiglo AGS. (2009). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis. 20 : 313–322.

Ma Y, Xiong YL. (2009). Antioxidant and bile acid binding activity of buckwheat protein in vitro digests. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57(10) : 4372-4380.

O'Sullivan AM, O'Callaghan YC, O'Connor TP, O'Brien NM. (2013). Comparison of the antioxidant activity of commercial honeys, before and after in-vitro digestion. Polish Journal of Food And Nutrition Sciences. 63 : 167-171.

Petchlert C. 2009. Evaluation of the digestion and absorption of certain phenolic compounds by Caco-2 cells. Utilization two novel methods: fluorescence microscopy and UV/visible spectroscopy. Ph.D. dissertation. University of Montpellier II, France.

Rez-Vicente PA, Izquierdo GA, Viguera GC. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 : 2308-2312.

Soto BMJ, Barbera´n TFA, Conesa GMT. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 102 : 865–874.

Tagliazucchi D, Verzellonib E, Bertolinia D, Contea A. (2009). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 : 599-606.

Tarko T, Chodak AD, Sroka P, Satora P, Michalik J. (2009). Transformations of phenolic compounds in an in vitro model simulating the human alimentary tract. Food Technology and Biotechnology. 47 : 456–463.

Tomczak WD (2007). Changes in antioxidant activity of black chokeberry juice concentrate solutions during storage. ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 6 : 49-55.

Zanwar AA, Badole SL, Shende PS, Hegde MV, Bodhankar SL. (2014). Cardiovascular effects of hesperidin: a flavanone glycoside. Polyphenols in Human Health and Disease. 2 : 989–992.

ภาคผนวก ก
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์
Antioxidant capacity of commercial citrus juices from supermarket in Thailand

Chatchawin Petchlert[1]*, Rayrai Kaewnoi[1], Atitayaporn Siriboot[1], Orasa Suriyapan[2]

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131 Thailand
[2] Department of Food Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131 Thailand

* Author for correspondence; E-Mail: chatchaw@buu.ac.th, Tel. +66 38103151, Fax. +66 38 393495

Abstract:

Citrus juices are the most popular fruits and juices widely consumed around the world. Citrus belongs to Rutaceae family that is cultivated in the tropical zone of Southeast Asia. Our current life style has encountered with free radicals and toxic metabolites in our body. Free radicals have been reported to be responsible for several diseases. Citrus juices contain biologically active compounds which possess antioxidant activity. They are essential components of functional food. Hence, the objective of this study was to determine the total phenolic content, total flavonoid content and the antioxidant activity of six citrus juices obtained from the supermarket in Chon Buri Province, Thailand: lime, leech lime, mandarin, tangerine, pomelo and orange juice concentrate. Antioxidant activity was measured by using DPPH and superoxide radical scavenging methods. Among the juices, lime juice had the highest content of total phenolic and total flavonoid (10.75±0.01mg gallic acid equivalent (GAE)/g sample and 34.18±9.69 mg hesperidin equivalent respectively/g sample). Leech lime juice had the greatest scavenging activity on DPPH radical (IC_{50}= 2.21±0.81% (v/v)) whereas orange juice concentrate had the highest inhibitory effect against superoxide radical (IC_{50}= 0.25±6.41% (v/v)). In addition, a correlation between the total phenolic contents and superoxide radical scavenging activity was observed with the correlation coefficient by 0.9854. The results revealed that phytochemicals from citrus juices might be used as a good source of natural antioxidant compounds.

1. Introduction

In recent years, clinical trials and epidemiological studies have established an inverse correlation between the intake of fruits and vegetables and the occurrence of chronic diseases, the most prevalent causes of death in the world. This protective effect has been attributed to the antioxidant properties, which coordinate and balance the body system to protect tissues and fluids from damage by reactive species or free radicals [1].

Citrus fruits (Rutaceae family) are an important source of antioxidants such as ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, and other phenolic compounds, and also some essential minerals for human nutrition. In Asian countries, citrus fruits, such as lime (*Citrus microcarpa* and *Citrus aurantifolia*), lemon (*Citrus limon*), and pomelo (*Citrus grandis*) are widely available and regularly consumed as whole fruits or fruit juices and preserved snacks. Among the phenolic compounds, flavanones are the major group found in citrus [2]. Various studies have shown that intake of flavonones is associated with reduced risk of developing coronary heart disease, degenerative diseases and anti-carcinogenicity because of their anti-lipid peroxidation [3-4].

The objective of the present study was to determine the total phenolic content, total flavonoid content and the antioxidant activity of six citrus juices obtained from the supermarket in Chon Buri, Thailand: lime, leech lime, mandarin, tangerine, pomelo and orange juice concentrate. Such activity was performed using DPPH and superoxide radical scavenging activity.

2. Materials and Methods

2.1 Sample Preparation

Pomelo juice (*Citrus maxima* (Burm.)), tangerine juice (*Citrus reticulata* Blanco), mandarin juice (*Citrus reticulata*) and orange juice concentrate were purchased from supermarkets in Chon Buri province. Lime juice (*Citrus aurantifolia* Swing.) and leech lime juice (*Citrus hystrix DC*) were obtained from local market at Chon Buri province. All juices were filtered through Whatman No.1 (Figure 1). Then, the juices were kept at 4^0C until use.

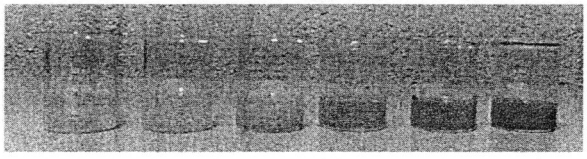


Figure 1. Samples of citrus fruit juice: (from left to right hand) pomelo, lime, leech lime, tangerine, mandarin juices and orange juice concentrate.

2.2 Total Phenolic Content

The phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu as reactive reagent. The absorbance of the sample was determined by a spectrophotometer at 765nm after it was incubated for 2h at room temperature. The average of triplicate measurements was used to calculate the phenolic content as mg gallic

acid equivalents (GAE)/ml samples. Gallic acid was used for the preparation of standard curve.

2.3 Total Flavonoid Content

The flavonoid content was measured by a modified aluminium chloride colorimetric method. The absorbance was measured at 510nm. The measurement was compared with a standard curve of hesperidin solutions and expressed as mg hesperidin equivalent; HE per ml sample.

2.4 DPPH Radical Scavenging Assay

The ability of citrus juices to scavenge commercially available and stable free radical DPPH was performed as the protocol mentioned by Aquino et al. [5]. Briefly, 0.2mM 2,2-diphenyl-1-picrylhdrazyl (DPPH) in methanol was prepared and each juice was adjusted to different concentrations. The solution was divided into 3 groups; group A: DPPH in methanol, group B: citrus juice and DPPH, and group C: citrus juice and distilled water. Then, all solutions were incubated at room temperature and avoided from light for 30min. the absorbance was measured at 517 nm using a microplate spectrophotometer (VERSA max Microplate reader, CA). The positive controls were BHT and ascorbic acid. The antioxidant capacity was expressed as %DPPH scavenging activity that calculated by [A-(B-C)]/A x100 where: A = the A_{517} of DPPH in methanol, B = A_{517} of DPPH and sample, C = A_{517} of sample and distilled water.

2.5 Superoxide Scavenging Activity

The superoxide anion scavenging activity was carried out by the method described by Beissenhirtz et al. [6] and it is based on the reduction of cytochrome c. One ml of the extract was mixed with 1 ml of the solution containing 0.07 units per ml of xanthine oxidase, xanthine (c = 100 μmol/l), and cytochrome c (c = 50 μmol/l). After incubation at 20°C for 3 min, the absorbance at 550 nm was determined. All tests were performed in triplicate. The superoxide anion scavenging activity was calculated as follows: Scavenging activity (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ where: A_0 = absorbance of the control (without the sample) and A_1 = absorbance of the mixture containing the sample.

2.6 Statistical Analysis

The data were expressed as means ± standard deviations (SD) of three replicate determinations and then analyzed by SPSS 11.5 for window. One way analysis of variance (ANOVA) and the Turkey's test were used to determine the differences among means. P values < 0.05 were regarded to be significant.

3. Results and Discussion

Table 1 shows total phenolic and total flavonoid contents. Lime juice, leech lime juice and orange juice concentrate contained higher contents of phenolic compounds than pomelo, tangerine and mandarin juices. A wide variation in the levels of polyphenols and flavonoids was observed in the analysis. The lowest level was observed in the mandarin juice (5.71±0.01mg GAE/ml) and the highest in the lime juice (10.75±0.01 mg GAE/ml) for total phenolic content and the lowest level was observed in the pomelo juice (0.84±0.13 mg HE/ml) and the highest in the lime juice (34.18±9.69 mg HE/ml) for total flavonoid content. Although citrus juices are recognized as providing an important source of vitamin C and phenolic compounds for human nutrition, there are other parts of the fruit which also contain these bioactive ingredients. However, these other parts of the fruit are not recognized in nutrition because they are generally the inedible components. Xu et al. [7] found that phenolic compounds dominated total antioxidant capacity of citrus fruits. Most phenolic compounds contained in citrus juices were flavonoid glycosides including hesperidin, narirutin, naringin, neohesperidin and phenolic acids such as caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, and vanillic acid.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents of different citrus fruit juices.

Sample	TPC mg GAE/ml	TFC mg HE/ml
Leech lime juice	10.63 ± 0.00	29.27 ± 7.31
Lime juice	10.75 ± 0.01	34.18 ± 9.69
Pomelo juice	7.71 ± 0.00	0.84 ± .0 13
Mandarin juice	5.71 ± 0.01	1.16 ± 0.43
Tangerine juice	7.17 ±0.00	1.43 ±0.0 5
Orange juice concentrate	10.57 ± 0.17	9.09 ± 6.54

TPC = Total phenolic content, TFC = Total flavonoid content, GAE = Gallic acid equivalent, HE = Hesperidin equivalent

The antioxidant capacity of citrus fruits is an important indicator of their *in vitro* potential as health promoters. Several methods have been developed to evaluate the antioxidant capacity of these fruits; for instance, phenolics in fruits have been monitored spectrophotometrically using the Folin–Ciocalteau reagent. The antioxidant capacity by DPPH and superoxide anion scavenging assays was selected to determine the total antioxidant capacities of citrus fruit juices. The results are shown in Tables 2-5.

Among the individual DPPH scavenging activity detected in the citrus juices, Leech lime, lime and pomelo juices exerted the most effective to scavenge the free radical (IC_{50} = 2.21 ± 0.81, 5.63 ± 1.47, 5.90 ± 0.29 %v/v, respectively) (Table 4). This may be due to its high contents of bioactive components. Flavanones in citrus fruits were previously used as markers to differentiate citrus varieties. The main flavanone glycosides in oranges and mandarin species are hesperidin and narirutin [8] that are able to act for this inhibitory phenomenon.

Table 2. % DPPH scavenging activity of different citrus fruit juices.

Concentration (% v/v)	%DPPH scavenging activity					
	Leech lime juice	Lime juice	Pomelo juice	Orange juice concentrate	Mandarin juice	Tangerine juice
0.3	18.10±6.03	12.96±2.99	13.05±2.96	23.07±6.12	-	-
0.6	29.74±13.60	16.06±3.64	13.27±0.74	24.51±9.39	-	-
1.25	41.17±12.90	22.02±5.43	20.60±0.82	25.97±8.80	-	-
2.5	54.25±1.66	32.91±9.64	28.77±2.04	37.58±7.68	-	-
5	87.77±5.97	49.25±18.85	45.35±0.50	61.65±8.72	-	-
10	93.68±0.69	78.52±10.90	76.04±2.97	72.40±4.41	35.07±11.85	39.84±3.75
20	-	-	-	-	56.55±12.43	51.72±5.42
40	-	-	-	-	72.97±16.98	64.80±8.90
60	-	-	-	-	83.76±9.47	75.99±4.42
80	-	-	-	-	95.13±8.97	84.34±9.78
100	-	-	-	-	96.28±10.89	87.21±10.28

Table 3. % Superoxide scavenging activity of different citrus fruit juices.

Concentration % v/v	% Superoxide scavenging activity					
	Leech lime juice	Lime juice	Orange juice concentrate	Pomelo juice	Mandarin juice	Tangerine juice
0.3	26.47±12.82	ND	56.85±14.36	-	-	-
0.6	37.47±9.99	8.70±11.94	59.12±14.26	-	-	-
1.25	47.93±7.76	16.81±12.15	67.47±13.96	-	-	-
2.5	65.01±4.28	35.88±11.64	76.18±21.38	-	-	-
5	79.33±1.52	62.42±8.99	80.29±20.87	-	-	-
10	97.23±0.14	83.92±4.46	99.70±24.04	23.60±13.34	ND	ND
20	-	-	-	39.23±9.39	ND	14.30±4.18
40	-	-	-	49.50±18.91	21.74±2.02	41.93±3.73
60	-	-	-	68.05±13.10	36.43±0.68	55.18±4.50
80	-	-	-	73.61±12.12	50.43±3.53	67.21±5.25
100	-	-	-	88.53±6.72	62.20±4.22	80.16±3.95

ND = Not determined

Table 4. IC_{50} of DPPH scavenging effect of different citrus fruit juices.

Sample	IC_{50} (%; v/v)
Leech lime juice	2.21 ± 0.81^{a}
Lime juice	5.63 ± 1.47^{a}
Pomelo juice	5.90 ± 0.29^{a}
Mandarin juice	16.71 ± 9.60^{b}
Tangerine juice	17.50 ± 5.00^{b}
Orange juice concentrate	4.95 ± 0.61^{a}

$^{a, b}$ significantly difference at $P < 0.05$

Table 5. IC_{50} of superoxide scavenging effect of different citrus fruit juices.

Sample	IC_{50} (%; v/v)
Leech lime juice	1.96 ± 1.74^{a}
Lime juice	4.94 ± 1.04^{a}
Pomelo juice	40.27 ± 12.51^{b}
Mandarin juice	80.79 ± 8.34^{b}
Tangerine juice	57.76 ± 4.77^{b}
Orange juice concentrate	0.25 ± 6.41^{a}

$^{a, b}$ significantly difference at $P < 0.05$

Because superoxide is quite toxic, the alleviation the toxicity by any compounds from edible plants is very interesting challenge. The highest superoxide radical scavenging activity of studied citrus juices was observed in orange juice concentrate with IC_{50} = 0.25±6.41 %v/v following by leech lime and lime juices (IC_{50} = 1.96±1.74 and 4.94±1.04, respectively) (Tables 3 and 5) as they were the most enriched in polyphenolic compounds. Interestingly, the correlations between antioxidant capacities and bioactive compounds of commercial citrus juices were observed (Figures 2A and 2B).

4. Conclusions

In conclusion, the antioxidant capacity of commercial citrus juices from local supermarket correlates both to phenolic and flavonoid constituents. There is increasing interest in the potential health benefits of natural antioxidants contained in this commercial drinks but little is known about their mechanism of actions. In this work, we have evaluated the bioactive ingredients and their functional assays to provide information on the antioxidant properties. We show that experimental approaches could be complementary for the screening of commercial citrus juices that are good candidates for disease prevention.

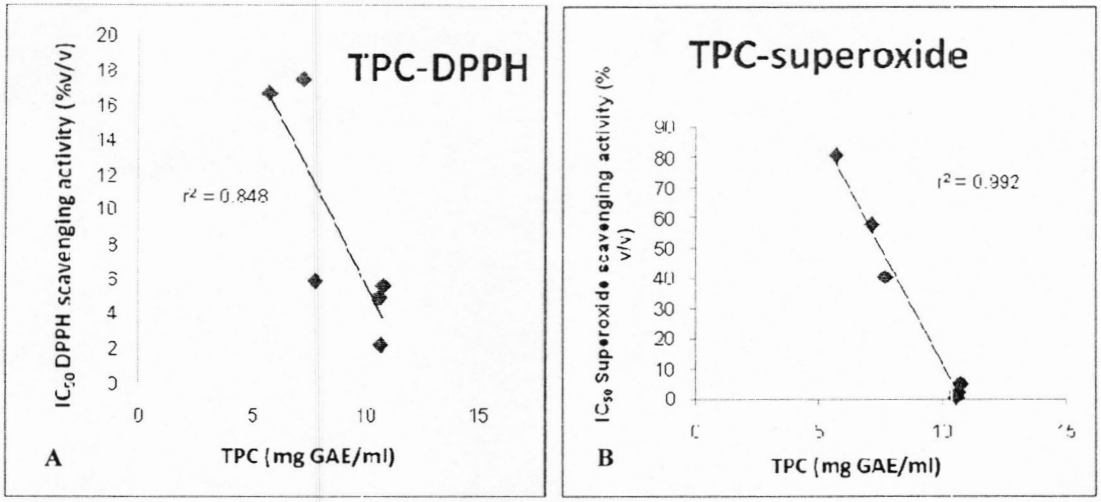


Figure 2. Correlation between total phenolic contents and IC_{50} of DPPH (A) and superoxide scavenging activities (B).

Acknowledgements

The authors gratefully thank to Burapha University for the financial support.

References

[1] H.R.M. Barros, T.A.P.C. Ferreira, M.I. Genovese, *Food Chem.* **134** (2012) 1892-1898.
[2] A.A. Franke, R.V. Cooney, S.M. Henning, L.J. Custer, *J. Agric. Food Chem.* **53(13)** (2005) 5170-5178.
[3] N. Martí, P. Mena, J.A. Cánovas, V. Micol, D. Saura, *Nat. Prod. Commun.* **4(5)** (2009) 677-700.
[4] H.L. Tsai, S.K. Chang, S.J. Chang, *J. Agric. Food Chem.* **55(8)** (2007) Apr 18 2867-72.
[5] R. Aquino, I.S. Morell, M.R. Lauro, S. Abdo, A. Saija, A.Tomaino, *J. Nat. Prod.* **64** (2000) 1019–1023.
[6] M.K. Beissenhirtz, R.C. Kwan, K.M. Ko, R. Renneberg, F.W. Schiller, F. Liskat, *Phytother. Res.* **18** (2004) 149–153.
[7] G. Xu, D. Liu, J. Chen, X. Ye, Y. Ma, J. Shi, *Food Chem.* **106** (2008) 545–551.
[8] M.V. Albertini, E. Carcouet, O. Pailly, C. Gambotti, F.O. Luro, L. Berti, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 8335–8339.