รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกในจังหวัดลพบุรี ด้วยวิธี DPPH

Antioxidant Activity of Young Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Planted in Lopburi Province by DPPH Assay

อาจารย์ ดร. ปิยวรรณ พันสี

สาขาวิชาเคมี (ค.บ.) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณสนับสนุนการวิจัยเพื่อสร้าง

องค์ความรู้มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้จากจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี (ปีงบประมาณ 2561) ที่ให้แก่ผู้วิจัย

ขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรีที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ดร. ภารดร งามดี สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี ที่ให้แนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์

ผู้วิจัย

ปิยวรรณ พันสี

2561

หัวข้อปัญหาพิเศษ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกในจังหวัดลพบุรีด้วยวิธี DPPH

ผู้วิจัย อ. ดร. ปิยวรรณ พันสี

สาขาวิชา ครุศาสตรบัณฑิต (เคมี)

ปีงบประมาณ 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกในระยะเวลาต่างกัน คือ 5 วัน 7 วัน 9 วัน และ 11 วัน ด้วยวิธี DPPH โดยเริ่มจากนำตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะต้นอ่อนทานตะวันในจังหวัดลพบุรีมาทำการสกัดผักด้วยเมทานอล จากนั้นทำให้แห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) นำสารสกัดที่ได้ไปละลายด้วยเมทานอลแล้วทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสารต้านอนุมูลอิสระ ค่าความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของตัวอย่าง และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก (AAE) ผลการทดลองพบว่าต้นอ่อนทานตะวันมีค่า IC_{50} ระหว่าง 965.99 - 3,281.96 $mg\ L^{-1}$ ซึ่งต้นอ่อนทานตะวันที่มีฤทธิ์การต้านอิสระสูงและเหมาะกับการบริโภคคือต้นอ่อนทานตะวันอายุ 7 - 9 วัน

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ต้นอ่อนทานตะวัน, วิธี DPPH, ลพบุรี

Special Project Problem Antioxidant Activity of Young Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Planted in Lopburi Province by DPPH Assay

Researcher Dr. Piyawan Phansi

Program Education Program in Chemistry

Fiscal Year 2018

Abstract

This work was a comparison of the free radical scavenging activity of young sunflower (*Helianthus annuus* L.) or sunflower sprout samples which cultivated at different time intervals (5, 7, 9, and 11 days) using DPPH assay. The samples were purchased from local farms in Lopburi province, and were extracted with methanol, and were dried by freeze dryer. After, the extracted solutions were dissolved in methanol, and then reacted with DPPH solution. The absorption values were measured with a spectrophotometer at 517 nm. The percentage of free radical scavenging (%radical scavenging), inhibitory concentration of 50% (IC_{50}), and ascorbic acid equivalent (AAE) were investigated. The IC_{50} value of each sample was obtained from the plotting between sample concentrations and %radical scavenging. The results showed that IC_{50} of sunflower sprout samples ranged from 965.99 - 3,281.96 mg L^{-1}.

Keywords: antioxidant activity, young sunflower, DPPH Assay, Lopburi

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 คำนิยามศัพท์	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1.1 ทานตะวัน	4
2.1.2 อนุมูลอิสระ	5
2.1.2.1 ความหมายของสารอนุมูลอิสระ	5
2.1.2.2 แหล่งกำเนิดของอนุมูลอิสระ	6
2.1.2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ	6
2.1.2.4 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	8
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย	14
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	15
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	15
3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	15

หน้า

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย 15
3.6 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 16
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล 28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 29
4.1 ผลการเตรียมตัวอย่างอ่อนทานตะวันโดยการสกัดด้วยเมทานอล 29
4.2 ฤทธิ์การต้านอนมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 30
4.3 ฤทธิ์การต้านอนมูลอิสระของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน 31
4.4 เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 40
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 44
5.1 สรุปผลการวิจัย 44
5.2 ข้อเสนอแนะ 45
บรรณานุกรม 46
ภาคผนวก 50
ประวัติผู้วิจัย 55

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 18
3.2 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน 19
3.3 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน 20
3.4 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน 21
3.5 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน 22
3.6 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน 23
3.7 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน 24
3.8 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน 25
3.9 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน 26
3.10 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากตลาด อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี 27
4.1 ผลของการสกัดตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน 29
4.2 แสดงค่า IC_{50} ของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน 40
4.3 แสดงค่า AAE ของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน 41

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ทานตะวัน (ก) เมล็ด (ข) ต้นอ่อน (ค) ดอกทานตะวัน	4
4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก	30
4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก	30
4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน	31
4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน	31
4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน	32
4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน	32
4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน	33
4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน	33
4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน	34
4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน	34
4.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน	35
4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน	35
4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน	36
4.14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน	36

รูปที่	หน้า

4.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน 37
4.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน 37
4.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน 38
4.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน 38
4.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากตลาดอำเภอเมืองลพบุรี จังหวัดลพบุรี 39
4.20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากจากตลาดอำเภอเมืองลพบุรี จังหวัดลพบุรี 39
ก1 ต้นอ่อนทานตะวัน 51
ก2 เครื่อง UV-Vis spectrophotometer 51
ก3 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator) 52
ก4 เครื่องเขย่าสาร (Shaker) 52
ก5 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) 52
ก6 ตัวอย่างสารสกัดแห้ง 53
ก7 DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 53
ก8 สารละลาย DPPH 53
ก9 ศึกษาวิธีการผลิตและจำหน่ายต้นอ่อนทานตะวัน จากผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวันในจังหวัดลพบุรี 54

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันสารอนุมูลอิสระ (free radical หรือ oxidant) ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากมีผลเสียต่อสุขภาพร่างกายมนุษย์ อนุมูลอิสระเมื่อทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย อาจทำให้การทำงานของสารชีวโมเลกุลเกิดความบกพร่อง ทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ เปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดการกลายพันธุ์และพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคอื่น ๆ เช่น โรคหัวใจ มะเร็ง ความดันโลหิตสูง เบาหวาน รูมาตอยด์ ความเสื่อมของเซลล์ประสาท ภาวะชรา เป็นต้น (Valko *et al*., 2007; สุกัญญา เขียวสะอาด, 2555) ซึ่งการเกิดสารอนุมูลอิสระมีสาเหตุมาจากปัจจัยภายในคือกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย และปัจจัยภายนอก เช่น ควันบุหรี่ ไอระเหยของสารอินทรีย์ สารฆ่าแมลง ไอเสียของรถยนต์ (Scott, DA *et al*., 2005; เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554) ดังนั้นคนเราจึงหันมารับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพื่อยับยั้งการก่อปัญหาสุขภาพที่เกิดสารอนุมูลอิระ โดยแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญมาจากพืช ผัก และผลไม้ ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี บีตาแคโรทีน แกมมา-โอรีซานอล สารประกอบฟีนอล (Podsędek *et al*., 2007)

ทานตะวันเป็นพืชเศรษฐกิจหลักอย่างหนึ่งของจังหวัดลพบุรี มีพื้นที่ปลูกประมาณ 40,000 ไร่ (สำนักงานเกษตรจังหวัดลพบุรี, 2556) ซึ่งผลิตผลที่สำคัญจากทานตะวัน ได้แก่ เมล็ดทานตะวัน น้ำมัน และต้นอ่อนทานตะวัน การเพาะเมล็ดงอกเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดให้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ยังไม่งอก ซึ่งปัจจุบันทานตะวันงอกหรือต้นอ่อนทานตะวันที่มีอายุประมาณหนึ่งสัปดาห์ กำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ เนื่องจากอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายในปริมาณที่สูง (สุชาวลีวรรณ ตรีเสิน และ ชนิกาญจน์ จันทร์มาทอง, 2559) มีโปรตีนมากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ วิตามินเอ บี ดี และอี รวมทั้งแร่ธาตุบางชนิด เช่น แมงกานิส ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (รักชนก ภูวพัฒน์ และคณะ, 2559)

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญที่ต้องมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันในจังหวัดลพบุรี เพื่อเป็นประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูก เป็นองค์ความรู้เผยแพร่ให้ประชาชนเห็นความสำคัญในการผลิตและบริโภคผักในท้องถิ่นต่อไป โดย

งานวิจัยนี้เลือกใช้วิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว (Jabbari and Jabbari, 2016) และนิยมใช้กันทั่วไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการปลูกต้นอ่อนทานตะวันต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดลพบุรี

1.2.3 เพื่อเป็นองค์ความรู้แก่ประชากรผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวัน สามารถนำเอาองค์ความรู้นี้ไปยืนยันคุณภาพด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันที่ผลิตได้

1.2.4 เพื่อเป็นองค์ความรู้ที่ได้สามารถเผยแพร่ความรู้แก่เกษตรกรผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวัน ประชาชนผู้บริโภคต้นอ่อนทานตะวัน ในทั้งถิ่นจังหวัดลพบุรีได้ และยังเป็นองค์ความรู้แก่องค์กรอื่น ๆ ที่สนใจ เพื่อให้เห็นความสำคัญและประโยชน์ของการบริโภคผักที่มีในท้องถิ่น

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ได้แก่ 5, 7, 9, และ 11 วัน โดยซื้อจากแหล่งเพาะต้นอ่อนทานตะวันที่ผลิตและจำหน่ายต้นอ่อนทานตะวันที่สำคัญของจังหวัดลพบุรี 2 แหล่ง ได้แก่ จากนางโชติรส เกตุน้อย ตำบลท่าศาลา อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ซึ่งใช้เมล็ดพันธุ์จากไร่ลุงท็อป ตำบลหนองบัว อำเภอพัฒนานิคม จังหวัดลพบุรี (แหล่งเพาะที่ 1) และนางน้องนุชวดี ภิญโญพงศ์ ตำบลนิคม อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ใช้เมล็ดพันธุ์เพาะต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกบริเวณเขาจีนแล อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี (แหล่งเพาะที่ 2) และตัวอย่างที่ซื้อจากตลาดสดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี

1.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวัน

ทำการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายสกัดต้นอ่อนทานตะวัน ด้วยวิธี DPPH แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อทานตะวันที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดลพบุรี

1.4.2 ประชากรผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวัน สามารถนำเอาองค์ความรู้นี้ไปยืนยันคุณภาพด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผักที่ผลิตได้

1.4.3 ได้องค์ความรู้ที่ได้สามารถเผยแพร่ความรู้แก่เกษตรกรผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวัน ประชาชนผู้บริโภคต้นอ่อนทานตะวัน ในทั้งถิ่นลพบุรีได้ และยังเป็นองค์ความรู้แก่องค์กรอื่น ๆ ที่สนใจ

1.5 คำนิยามศัพท์

1.5.1 อนุมูลอิสระ (Free Radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในวงอิเล็กตรอนนอกสุด คุณสมบัติเฉพาะของอนุมูลอิสระ คือ มีความว่องไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น

1.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารที่มีหน้าที่ต่อต้าน ขจัด หรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

1.5.3 Half maximum inhibitory concentration (IC_{50}) คือ ปริมาณของสารต้านออกซิเดชัน ที่ทำให้ ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50%

1.5.4 % radical scavenging คือ ร้อยละการยับยั้ง

1.5.5 AAE คือ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid equivalent)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ทานตะวัน

2.1.1.1 ข้อมูลทั่วไป

ทานตะวันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* L. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Asteraceae (Compositae) จัดอยู่ในแฟมิลี่ Compositene เป็นพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง สามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด ทานตะวันเป็นพืชอันดับสองที่เป็นแหล่งของน้ำมันที่ใช้ในการบริโภค ปัจจุบันคนหันมาใส่ใจเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะการหันมาบริโภคผักซึ่งเป็นแหล่งของสารอาหารที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ ทุกส่วนของต้นทานตะวันมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เมล็ดมีคุณสมบัติเป็นยาแก้ท้องเสีย ขับ เสมหะ รักษาอาการหวัด อาการไอ อาการเจ็บคอ และโรคปอด และใช้ดอกในการรักษาโรคมะเร็ง (Dwivedi, Sharma & Kaushik et al., (2015); Ceccarini, Macchia & Flamini et al., (2004); รักชนก ภูวพัฒน์ และคณะ, 2559)

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 2.1 ทานตะวัน (ก) เมล็ด (ข) ต้นอ่อน (ค) ดอกทานตะวัน

2.1.1.2 การผลิตต้นอ่อนทานตะวัน

ปัจจุบันต้นอ่อนทานตะวันหรือต้นทานตะวันงอกเป็นผักที่ได้รับความนิยมต่อกลุ่มคนรักสุขภาพเนื่องจากอุดมสมบูรณ์ไปด้วยคุณค่าสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสูง (สุชาวลีวรรณ ตรีเสิน และ ชนิกาญจน์ จันทร์มาทอง, 2559) การเพาะต้นอ่อนทานตะวันตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดไปจนถึงเก็บเกี่ยว ปกติใช้เวลาไม่เกิน 7 วัน และใช้วัสดุที่หาได้ง่าย และใช้ต้นทุนต่ำ ต้นอ่อน

ทานตะวันนอกจากจะเป็นผักปลอดสารพิษที่ไม่ใช้สารเคมีในการเพาะปลูกแล้ว ยังสามารถนำไปทำอาหารเป็นเมนูหลากหลาย ยำต้นอ่อนทานตะวัน ผัดน้ำมันหอย สลัดต้นอ่อนทานตะวัน ทำเป็นผักจิ้มน้ำพริก เป็นต้น สำหรับวิธีการเพาะต้นอ่อนทานตะวันสามารถทำได้โดยนำเมล็ดทานตะวันล้างน้ำ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดผงฝุ่นที่ติดมาให้หมดไป แล้วแช่น้ำทิ้งไว้ 8 - 10 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมดินโดยใช้มูลไส้เดือนผสมขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1:3 หรือจะใช้วัสดุปลูกอะไรก็ได้ที่หาได้ง่ายใกล้บ้าน เช่น ดินปลูกทั่วไปใส่ดินหนาประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วนำเมล็ดที่ผ่านการแช่น้ำ มาเรียงปลูกให้ทั่วภาชนะอย่าให้เมล็ดทับกันเพื่อให้มีพื้นที่การงอกไม่แน่นเกินไป เรียงเมล็ดแล้วรดน้ำให้ชุ่ม วางไว้ในที่ร่มรดน้ำเช้า-เย็น เมื่อต้นอ่อนอายุได้ 4 วัน จะนำออกไปโดนแสง เพื่อให้สังเคราะห์แสง จากนั้นอีก 3 วัน สำหรับวิธีเก็บเกี่ยวผลผลิต รวบต้นกล้าแล้วดึงขึ้นมาเบา ๆ ตัดส่วนรากทิ้งไป นำต้นอ่อนใส่ถุงพลาสติกแล้วแช่ในตู้เย็น สามารถเก็บไว้บริโภคได้ 1 สัปดาห์ (ไชยรัตน์ ส้มฉุน, 2557)

2.1.2 อนุมูลอิสระ

2.1.2.1 ความหมายของสารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา ดังแสดงในสมการที่ 1 และ 2

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \quad \text{(สมการ 1)}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \quad \text{(สมการ 2)}$$

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, transition metals (โลหะทรานซิชัน), carbonate radical ($CO_3^{\bullet -}$), nitrate radical ($NO_3^{\bullet}$), methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), reactive oxygen species

(ROS) เป็นต้น (Halliwell, 1994, 1999; พันธุ์สวรรค์, 2556) นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน (collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Halliwell, 1994)

2.1.2.2 แหล่งกำเนิดของอนุมูลอิสระ

แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ (sources of free radical) มีสาเหตุมาจากปัจจัยภายในสิ่งมีชีวิตคือกระบวนการเผาผลาญของร่างกายและปัจจัยภายนอกสิ่งมีชีวิต (เจนจิรา จิรัมย์, 2554; บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) ปัจจัยภายนอกสิ่งมีชีวิต ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลตรังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา (Halliwell *et al.*, 1995) จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ (Bast *et al.*, 1991) จากยารักษาโรคบางชนิดยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin) แอนทราไซคลินส์ (antracyclines) และ เมโธทรีเสต (methotrexate) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Gressier *et al.*, 1994)

2.1.2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่ง

ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการที่ 3 และ 4 (เจนจิรา จิรัมย์ , 2554; บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \quad \text{(สมการ 3)}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \quad \text{(สมการ 4)}$$

โดย $R^{\bullet}$ และ $RO^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propylgallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป (Pokorny *et al*., 2001) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ glutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโต พลาซึมและเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน $O_2^{\bullet-}$ เป็น H_2O_2

ในภาวะปกติร่างกายของคนเรา จะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน (β-carotinoid) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (เจนจิรา จิรัมย์, 2554)

2.1.2.4 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) ซึ่งการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอนความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ (เช่น Shinoda test และ Pew test) โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Stratil *et al*., 2006)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (เช่น trolox, vitamin C และ ferrous sulfate) (Floegel *et al*., 2011) อย่างไรก็ตามวิธีดีพีพีเอสมีข้อดีกว่าวิธีเอบีทีเอสคือรีเอเจนต์ DPPH มีความเสถียรมากกว่ารีเอเจนต์ ABTS (Toit *et al*., 2001)

(1) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay) หรือการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ 5) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืด

เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \qquad \text{(สมการ 5)}$$

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ตัวอย่างสารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น โทรล็อกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ µM/mg ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว (Jabbari and Jabbari, 2016) แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจมีสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน (Lee *et al.*, 2008; บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

(2) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอช (ABTS assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส(ABTS•+,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการ 6) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH

$$ABTS^{\bullet+} + AH \text{ (antioxidant)} \longrightarrow ABTS \text{ (สีจางลง)} + A^{\bullet} \qquad \text{(สมการ 6)}$$

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำ ละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง (Re *et al.*, 1999) ส่วนข้อเสีย คือ

$ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

(3) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (FRAP assay)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)^{2}]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ (ดังสมการ 7) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+} \xrightarrow{\text{antioxidant}} [Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+} \quad \text{(สมการ 7)}$$

ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ประกอบด้วยนำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเทตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำ ปราศจากไอออน (deionized water) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในพืช ผัก และผลไม้ต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ (Moon and Shibamoto, 2009; Podsędek, 2007) ตัวอย่างเช่น

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคณะ ได้ศึกษาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดเหง้าข่าลิงหรือข่าป่า (*Alpinia conchigera* Griff.) ชั้นเฮกเซน (hexane) เอทธิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) และศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทในหนูขาว โดยสกัดสารจากเหง้าข่าลิงโดยวิธีเปอร์โคเลชันด้วยเฮกเซน เอทธิลอะซิเตท และเมทานอล วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองด้วย DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิกที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดด้วยความร้อน ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในสัตว์ทดลองโดยเหนี่ยวนำให้หนูขาวเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ในวันสุดท้ายหลังได้รับสารสกัดข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทในขนาด 100, 200 และ 500 mg/kg ทุกวันนาน 28 วัน เก็บตับและสมองเพื่อวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทธิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดคือ 120.44 ± 0.01 μg/mg ผลการศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระพบค่า IC_{50} เท่ากับ 12.32 ± 0.28 μg/mg เมื่อทดสอบด้วย DPPH assay และมีค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) เท่ากับ 26.02 ± 1.92 mM/mg เมื่อทดสอบด้วย ABTS assay ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay มีค่า FRAP value 1.16 ± 0.05 mM/mg (นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคณะ, 2554)

ประวิทย์ สันติวัฒนา และจิตตินันท์ ปานประไพ ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม มะเขือเทศ และงาดำ ด้วยวิธี DPPH ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันรำข้าวมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มน้ำมันพืช และพบว่างาดำมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงคือมะเขือเทศราชินี มะเขือเทศสตรอเบอรี น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลือง เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับ IC_{50} เท่ากันพบว่าน้ำมันรำข้าวที่มีแกมมา-โอรีซานอล 9,200 ppm ปริมาณ 1 ช้อนโต๊ะ เทียบเท่ากับมะเขือเทศสตรอเบอรี 1 ลูก (6.98 g) มะเขือเทศราชินี 2 ลูก (5.28 g) และงาดำ 5.87 g (ประวิทย์ สันติวัฒนา และ จิตตินันท์ ปานประไพ, 2559)

Toit *et al.* (2001) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ ผัก และชาหลายชนิดด้วยวิธี DPPH ผลการศึกษาพบว่าปริมาณชาหนึ่งหรือสองถ้วยมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า total radical scavenging capacity (RSC) เท่ากับผลไม้และผักห้าส่วน (portions) หรือมีค่าเท่ากับค่าการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี 400 mg (Toit *et al.*, 2001)

Ismail *et al.* (2004) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีโนลิกในผัก ได้แก่ ผักคะน้า (Kale), ผักโขม (spinach), กะหล่ำปลี (cabbage), กะหล่ำปลีบึง (swamp cabbage) และหอมแดง (shallots) ผลการศึกษาพบว่า ผักโขมมีค่าการต้านอนุมูลอิสระรวม (total antioxidant activity) สูงที่สุด รองลงมาคือ กะหล่ำปลีบึง กะหล่ำปลี และผักคะน้าตามลำดับ และพบว่าผักโขมมีปริมาณฟีโนลิกรวม (total phenolic) สูงที่สุด รองลงมาคือ กะหล่ำปลีบึง ผักคะน้า หอมแดงและกะหล่ำปลี ตามลำดับ (Ismail *et al.*, 2004)

Wootton-Beard *et al.* (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity) และปริมาณฟีนอล (total polyphenol) ในน้ำผัก 23 ชนิด โดยใช้วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{•}$), 2, 2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{•+}$) และ Folin–Ciocalteu Reagent (FCR) สำหรับการวิเคราะห์ค่าปริมาณฟีนอล ผลการทดลองพบว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวีธี FRAP มีค่าระหว่าง 1369–9500 µmol/L ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวีธี $DPPH^{•}$ มีค่าระหว่าง 57.8–100% inhibition และผลจากการวิเคราะห์ด้วยวีธี $ABTS^{•+}$ มีค่า 10.9–90.7% inhibition และปริมาณฟีนอล (total polyphenol) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี FCR มีค่าเท่ากับ 449–3025 µg และพบว่าน้ำบีทรูท (Beetroot) มีค่าการต้านต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity) และปริมาณฟีนอล (total polyphenol) มากที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำผลไม้ อื่น ๆ (Wootton-Beard *et al.*, 2011)

Skotti *et al.* (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยใช้วิธี DPPH assay และ ABTS assay และปริมาณฟีโนลิค (total phenolic) ในตัวอย่างพืชสมุนไพรและพืชมีกลิ่นหอมในประเทศกรีก ได้แก่ เลม่อนบาล์ม หรือสะระแหน่ฝรั่ง (lemon balm) เสจ (sage) ออริกาโน (oregano) ฮิสซอฟ (Hyssop) และคิตทานี จากการศึกษาพบว่าเลม่อนบาล์มมีปริมาณฟีโนลิคมากที่สุด (0.985 ± 0.001 mg caffei acid/mL) และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (6.61 ± 0.04 µmol Trolox/mL) เมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ (Skotti *et al.*, 2014)

จากงานวิจัยสรุปได้ว่า ส่วนใหญ่จะทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากพืชด้วยวิธี DPPH ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวัน ด้วยวิธี DPPH เนื่องจากเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเพื่อใช้ในการศึกษาหาปริมาณสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งยังหาได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และราคาไม่แพง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันที่ใช้ระยะในการปลูกต่างกัน โดยนำตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันมาทำการสกัด และนำไปทำปฏิกิริยากับ DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการทดลองนั้นได้ทำการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีที่ความยาวคลื่น 517 nm

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ได้แก่ 5, 7, 9, และ 11 วัน โดยซื้อจากแหล่งเพาะต้นอ่อนทานตะวันที่ผลิตและจำหน่ายต้นอ่อนทานตะวันที่สำคัญของจังหวัดลพบุรี 2 แหล่ง ได้แก่ จากนางโชติรส เกตุน้อย ตำบลท่าศาลา อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ซึ่งใช้เมล็ดพันธุ์จากไร่ลุงท็อป ตำบลหนองบัว อำเภอพัฒนานิคม จังหวัดลพบุรี (แหล่งเพาะที่ 1) และนางน้องนุชวดี ภิญโญพงศ์ ตำบลนิคม อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ใช้เมล็ดพันธุ์เพาะต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกบริเวณเขาจีนแล อำเภอเมืองลพบุรี จังหวัดลพบุรี (แหล่งเพาะที่ 2) และตัวอย่างที่ซื้อจากตลาดสดในเขตอำเภอเมืองลพบุรี จังหวัดลพบุรี

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 ปิเปต (Pipette) 1, 5 mL

3.2.2 หลอดหยด (dropper)

3.2.3 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 200 mL

3.2.4 ลูกยาง (rubber bulb)

3.2.5 กระดาษกรอง (Filter paper) เบอร์ 1, Whatman filter

3.2.6 กรวยกรอง (Funnel)

3.2.7 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 mL

3.2.8 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.9 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) 10, 25, 50, 100 mL

3.2.10 หลอดไมโครเซนติฟิ้ว ขนาด 5 mL (Micro-centrifuge tube)

3.2.11 แท่งแก้ว (Stirrer)

3.2.12 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Analytical Balance)

3.2.13 ไมโครปิเปต (Micropipette) 50-200 µL, 100-1000 µL,

3.2.14 อลูมิเนียมฟอยล์

3.2.15 เขียง และมีด

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-vis spectrophotometer) ยี่ห้อ Lab Tech รุ่น UV 1900 D ผลิตที่ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.2 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator) ยี่ห้อ BUCHI Rotavapor R-124 ผลิตที่ประเทศเยอรมัน

3.3.3 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ LABCONCO ผลิตที่ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.4 เครื่องเขย่าสาร (Shaker) ยี่ห้อ Lab-Shaker LS-X ผลิตที่ประเทศจีน

3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.1 เมทานอล (Methanol) เกรด AR สูตรโมเลกุล CH_3OH มวลโมเลกุล 32.04 g/mol ยี่ห้อ Lab scan ผลิตที่ประเทศไอร์แลนด์

3.4.2 กรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic acid) เกรด AR สูตรโมเลกุล $C_6H_8O_6$ มวลโมเลกุล 176.12 g/molยี่ห้อ Sigma - Aldrich ผลิตที่ประเทศเยอรมัน

3.4.3 ดีพีพีเอช [DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)] เกรด AR สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{12}N_5O_6$ มวลโมเลกุล 394.32 g/mol ยี่ห้อ SIGMA-ALDRICH ผลิตที่ประเทศเยอรมัน

3.4.4 น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water)

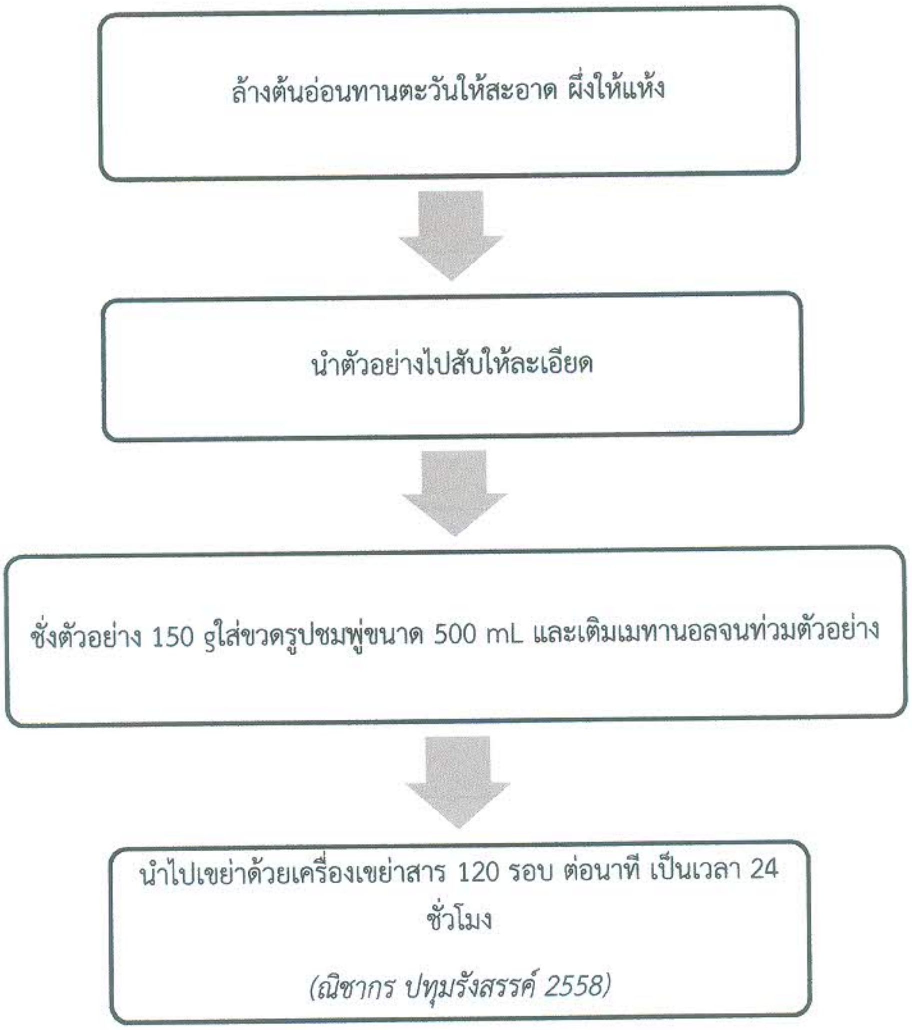
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทางตะวันทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกโดย คุณผิง 4 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลา 5, 7, 9 และ 11 วัน ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันที่ปลูกโดย คุณนุช 4 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลา 5, 7, 9 และ 11 วัน และตัวอย่างที่ซื้อจากตลาดสดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี จำนวน 1 ตัวอย่าง

โดยนำต้นอ่อนทานตะวันไปสกัดแล้วทำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ และนำไปทำปฏิกิริยากับ ดีพีพีเอช จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดหาค่าดูดกลืนแสงจากสีของสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วคำนวณค่า % radical scavenging ค่า IC_{50} และค่าการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก (AAE)

3.6 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.6.1 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน (Mrazek *et al.*, 2012)



นำตัวอย่าง ที่ได้ไปกรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรองเบอร์ 1

↓

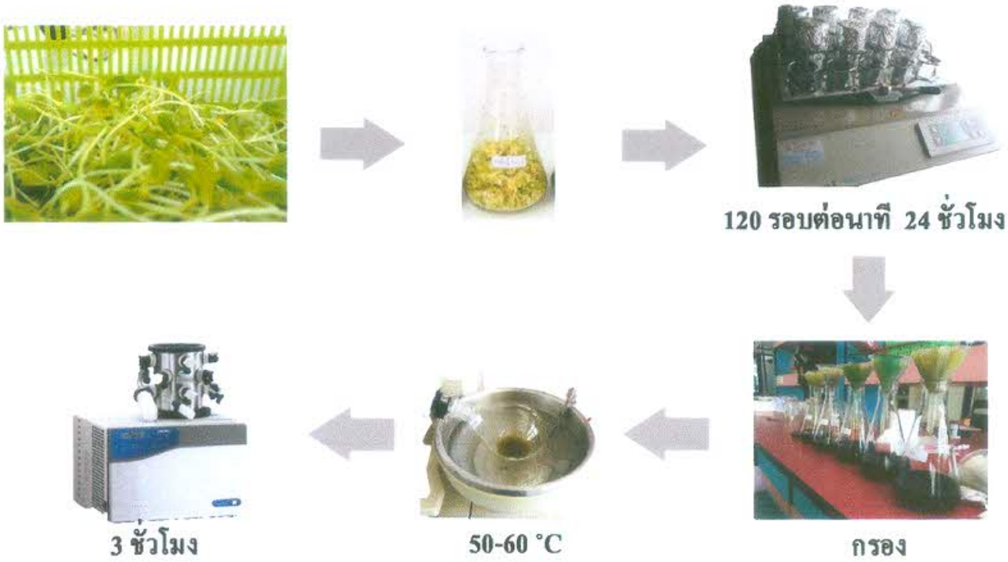
นำไปเข้าเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50-60 °C ให้สารมีปริมาตรน้อยที่สุด หรือประมาณ 1-2 mL *(ณิชากร ปทุมรังสรรค์ 2558)*

↓

นำตัวอย่างสกัดที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชา และนำไปแช่ตู้ที่อุณภูมิ -40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

นำตัวอย่างสกัดไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



3.6.2 การเตรียมสารเคมี

3.6.2.1 DPPH ความเข้มข้น 2.0 mmol L^{-1} ปริมาตร 25 mL

ชั่ง DPPH มา 0.0098 g ปรับด้วย เมทานอล 25 mL เขย่าให้สารเข้ากันและหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ (ประวิทย์ สันติวัฒนา และ จิตตินันท์ ปานประไพ, 2559)

3.6.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก เข้มข้น 5,000 mg L^{-1}

ชั่งกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) มา 0.125 g ปรับด้วย น้ำ DI 25 mL จะได้ สารละลายวิตามินซีเข้มข้น 5,000 mg L^{-1}

3.6.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.00, 1.67, 2.50, 3.33, 4.00, 5.00, 6.00 และ 7.50 mg L^{-1} ตามลำดับ แล้วเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

ความเข้มข้น (mg L^{-1})	**ปริมาณกรดแอสคอร์บิก 5,000 ppm (µL)**	**ปริมาณ 2.0 mmol L^{-1} DPPH (µL)**		
0.00	0	200	ปรับด้วยเมทานอลจนมีปริมาตร 3 mL	หลังจากนั้นหุ้มอลูมิเนียมฟอยล์ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ก่อนทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 nm
1.67	100	200		
2.50	150	200		
3.33	200	200		
4.00	240	200		
5.00	300	200		
6.00	360	200		
7.50	450	200		

3.6.3 การวิเคราะห์หาค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวัน (Mrazek *et al.*, 2012; ประวิทย์ สันติวัฒนา และ จิตตินันท์ ปานประไพ, 2016; บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

3.6.3.1 ต้นอ่อนทานตะวันที่ซื้อจากแหล่งเพาะที่ 1

นำตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันซึ่งปลูกในระยะเวลาต่างกันคือ 5 วัน 7 วัน 9 วัน และ 11 วัน ที่ผ่านการสกัดแล้ว มาชั่งน้ำหนักและละลายด้วยเมทานอล

(1) ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 - 2,000 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.2 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.2 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg L^{-1})	สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 mg L^{-1} (µL)	2.0 mmol L^{-1} DPPH (µL)	ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร
0	-	200	3 mL
333.33	100	200	3 mL
666.67	200	200	3 mL
1,000.00	300	200	3 mL
1333.33	400	200	3 mL
1666.67	500	200	3 mL
2,000.00	600	200	3 mL

(2) **ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน**

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 2,333.33 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.3 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.3 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg L^{-1})	**สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 mg L^{-1} (µL)**	**2.0 mM DPPH (µL)**	**ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร**
0	-	200	3 mL
333.33	100	200	3 mL
666.67	200	200	3 mL
1,000.00	300	200	3 mL
1333.33	400	200	3 mL
1666.67	500	200	3 mL
2,000.00	600	200	3 mL
2,333.33	700	200	3 mL

(3) **ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน**

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 2,666.67 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.4 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.4 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg L^{-1})	**สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 mg L^{-1} (μL)**	**2.0 mmol L^{-1} DPPH (μL)**	**ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร**
0	-	200	3 mL
333.33	100	200	3 mL
666.67	200	200	3 mL
1,000.00	300	200	3 mL
1333.33	400	200	3 mL
1666.67	500	200	3 mL
2,000.00	600	200	3 mL
2,333.33	700	200	3 mL
2,666.67	800	200	3 mL

(4) ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 6,000.00 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.5 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.5 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง ($mg\ L^{-1}$)	**สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 $mg\ L^{-1}$ (μL)**	**2.0 $mmol\ L^{-1}$ DPPH (μL)**	**ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร**
0	-	200	3 mL
333.33	100	200	3 mL
1,000.00	300	200	3 mL
2,000.00	600	200	3 mL
3,000.00	900	200	3 mL
4,000.00	1,200	200	3 mL
5,000.00	1,500	200	3 mL
6,000.00	1,800	200	3 mL

3.6.3.2 ต้นอ่อนทานตะวันที่ซื้อจากแหล่งเพาะที่ 2

นำตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันซึ่งปลูกในระยะเวลาต่างกันคือ 5 วัน 7 วัน 9 วัน และ 11 วัน ที่ผ่านการสกัดแล้ว มาชั่งน้ำหนักและละลายด้วยเมทานอล

(1) ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 3,333.33 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.6 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.6 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg L^{-1})	สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 mg L^{-1} (µL)	2.0 mmol L^{-1} DPPH (µL)	ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร
0	-	200	3 mL
666.67	200	200	3 mL
1,333.33	400	200	3 mL
1,666.67	500	200	3 mL
2,000.00	600	200	3 mL
2,666.67	800	200	3 mL
3,333.33	1,000	200	3 mL

(2) ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 2,666.67 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.7 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.7 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg L^{-1})	**สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 mg L^{-1} (μL)**	**2.0 mM DPPH (μL)**	**ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร**
0	-	200	3 mL
666.66	200	200	3 mL
1,000.00	300	200	3 mL
1,333.33	400	200	3 mL
1,666.67	500	200	3 mL
2,000.00	600	200	3 mL
2,333.33	700	200	3 mL
2,666.67	800	200	3 mL

(3) ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 2,333.33 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.8 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.8 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg L^{-1})	**สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 mg L^{-1} (µL)**	**2.0 mmol L^{-1} DPPH (µL)**	**ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร**
0	-	200	3 mL
333.33	100	200	3 mL
666.67	200	200	3 mL
1,000.00	300	200	3 mL
1333.33	400	200	3 mL
1666.67	500	200	3 mL
2,000.00	600	200	3 mL
2,333.33	700	200	3 mL

(4) ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน

เตรียมสารต้นอ่อนทานตะวัน ความเข้มข้น 10,000 mg L^{-1} ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 10 mL

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 g ปรับด้วนเมทานอลจนมีปริมาตร 50 mL และกรองตัวอย่าง

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 3,000.00 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.9 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.9 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg L^{-1})	**สารสกัดถั่วเขียวงอก 10,000 mg L^{-1} (µL)**	**2.0 mmol L^{-1} DPPH (µL)**	**ปรับด้วยเมทานอลจนครบปริมาตร**
0	-	200	3 mL
333.33	100	200	3 mL
1,000.00	300	200	3 mL
1,333.33	400	200	3 mL
1,666.67	500	200	3 mL
2333.33	700	200	3 mL
3,000.00	900	200	3 mL

3.6.3.3 **ต้นอ่อนทานตะวันที่ซื้อจากตลาดท้องถิ่น อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี**

เตรียมสารลายตัวอย่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0 – 5,000.00 mg L^{-1} แล้วทำการเติม 2.0 mmol L^{-1} DPPH ดังตารางที่ 3.10 ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ความยาวคลื่น 517 nm

ตารางที่ 3.10 การตรียมสารสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากตลาด อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี

ความเข้มข้นตัวอย่าง (mg L^{-1})	**ปริมาณ 2.0 mM DPPH (µL)**		
0	700	ปรับด้วยเมทานอลจนมีปริมาตร 10 mL	หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ก่อนทำการวัดค่าดูดกลืนแสง
1000	700		
2000	700		
3000	700		
4000	700		
5000	700		

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

จากการสกัดตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันด้วยเมทานอล สามารถคำนวณร้อยละของสารที่สกัดได้ (% yield) ได้จาก

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดแห้ง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักผักสด (กรัม)}} \times 100$$

จากกการทดลองหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวัน ผู้วิจัยได้ทำการหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และนำข้อมูลมาคำนวณจากสูตรค่าร้อยละการยับยั้ง (% radical scavenging), IC_{50} และค่า ascorbic acid equivalents (AAE)

การคำนวณ DPPH radical scavenging (%)

DPPH radical scavenging (%) = $[(A_0-A_s)/A_0] \times 100$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

การหาค่า ascorbic equivalent (AAE)

(1) สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ ascorbic acid และค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ ความยาวคลื่น 517 nm และหาสมการเส้นตรง

(2) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างคำนวณเป็นค่า % Radical scavenging แล้วนำไปแทนค่าในสมการเส้นตรงจะได้ค่า ascorbic equivalent

การหาค่าความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

ค่า IC_{50} หาได้จาก % radical scavenging (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ที่ 50%

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเตรียมตัวอย่างอ่อนทานตะวันโดยการสกัดด้วยเมทานอล

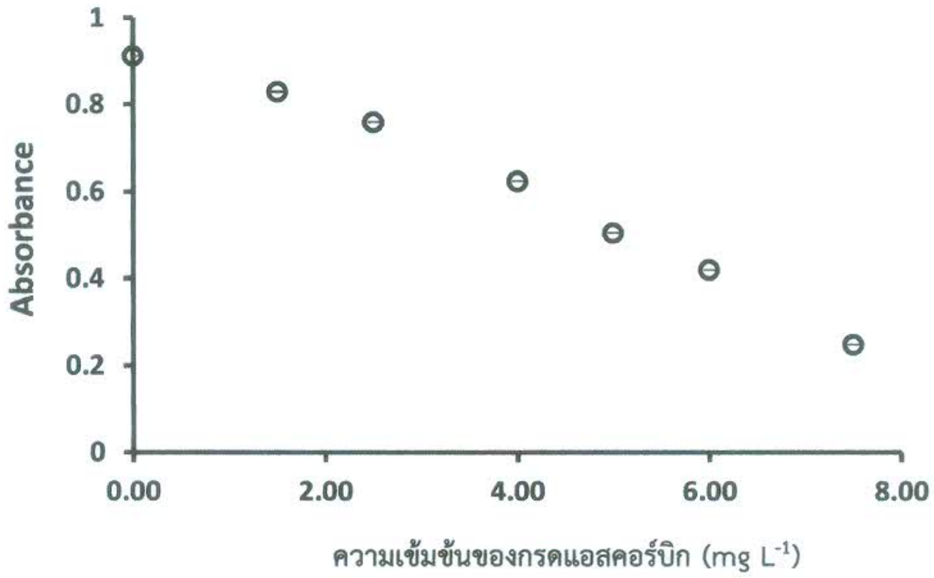
จากการนำตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันมาสกัดด้วยเมทานอล นำไปเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง จะได้น้ำหนักสารสกัดแห้ง และ% yield ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4.1 ผลของการสกัดตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน

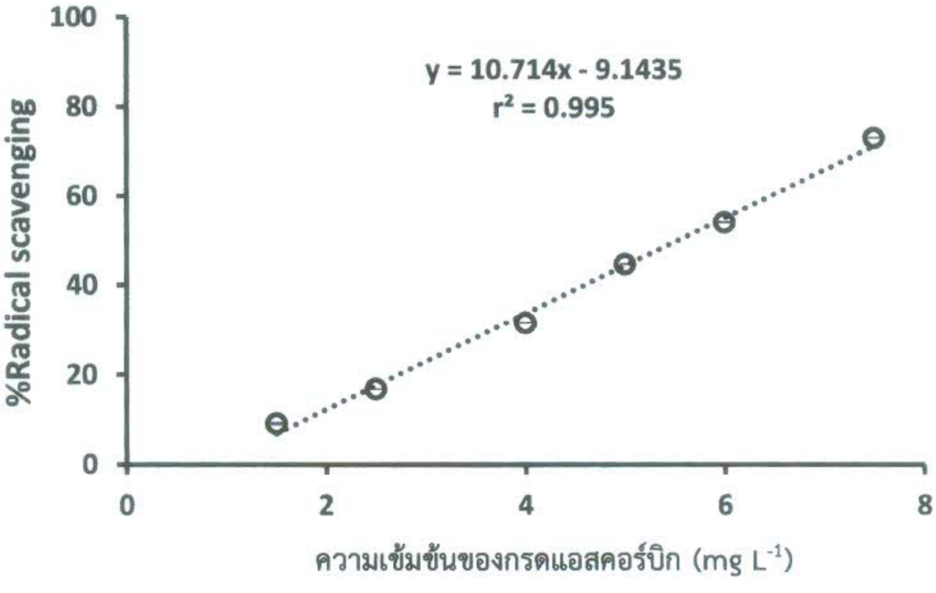
ตัวอย่างผัก	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (กรัม)	% yield
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน	150.003	1.891	1.26
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน	150.001	1.767	1.18
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน	150.570	1.667	1.11
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน	150.000	1.955	1.30
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน	150.001	2.565	1.71
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน	150.000	3.465	2.31
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน	150.002	3.036	2.02
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน	150.007	3.110	2.07
ต้นอ่อนทานตะวันจากตลาด อ. เมืองลพบุรี	150.005	1.865	1.24

% yield ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันได้ค่าระหว่าง 1.11 - 2.31 % ซึ่งพบว่าตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 มีค่า % yield อยู่ระหว่าง 1.71 - 2.31 ซึ่งมากกว่าค่า % yield ของการสกัดต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.11 - 1.30 และตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากตลาด อ. เมืองลพบุรี มีค่า % yield 1.24 ซึ่งการที่ค่า % yield จากการสกัดตัวอย่างจากแหล่งเพาะที่ 2 มีค่าสูงกว่าแหล่งเพาะอื่น อาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น แหล่งเมล็ดพันธุ์ที่ต่างกัน วิธีการเพาะ ปริมาณน้ำ ปริมาณสารอาหารในดินที่ใช้เพาะต้นอ่อนที่แตกต่างกัน เป็นต้น

4.2 ฤทธิ์การต้านอนมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก



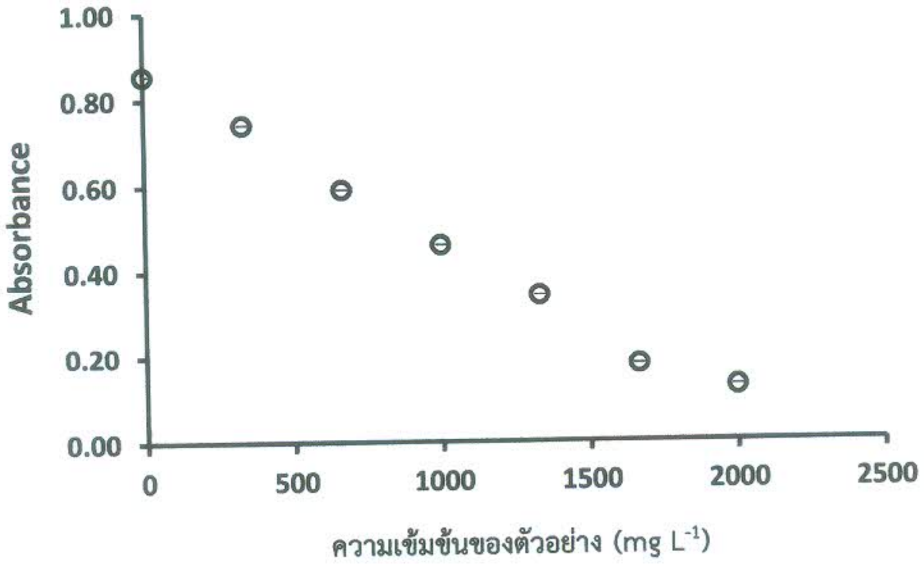
รูปที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก



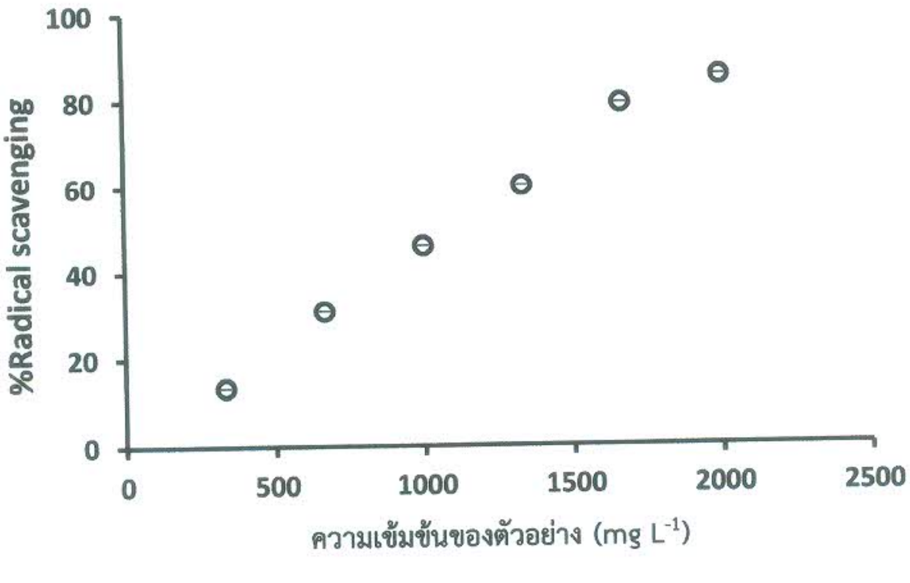
รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก

4.3 ฤทธิ์การต้านอนมูลอิสระของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน

4.3.1 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน

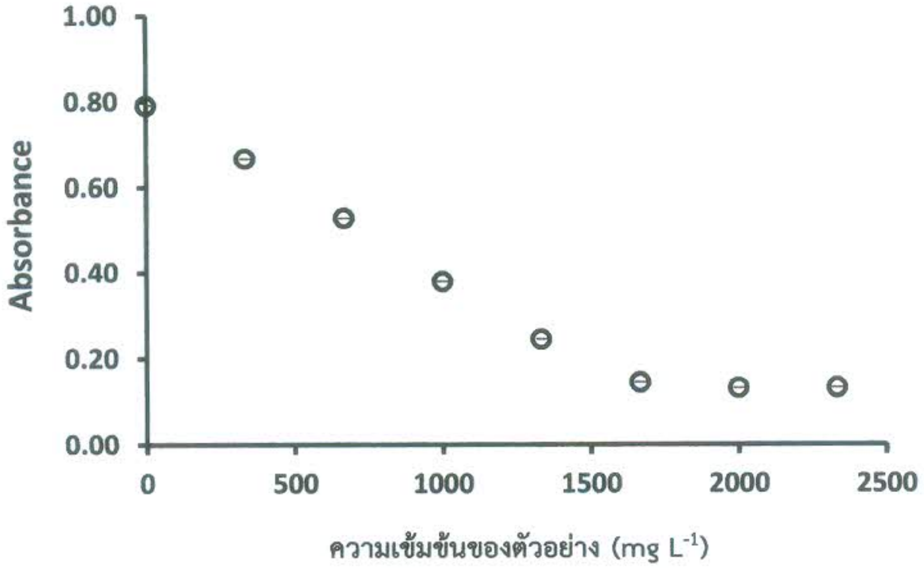


รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน

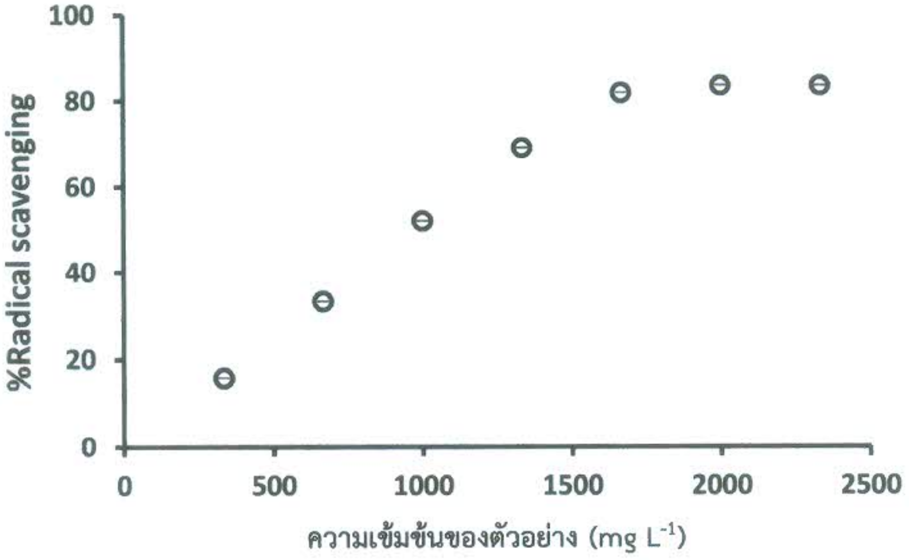


รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน

4.3.2 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน

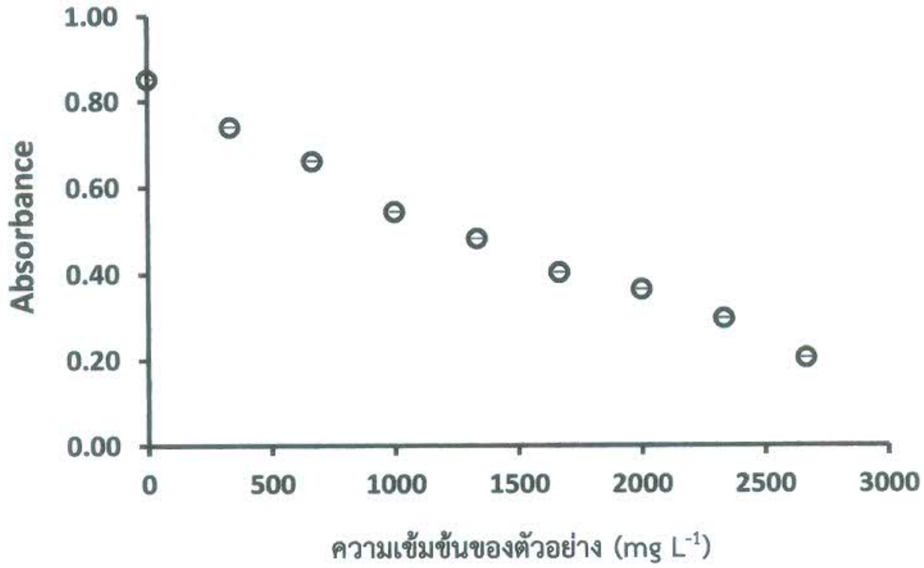


รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน

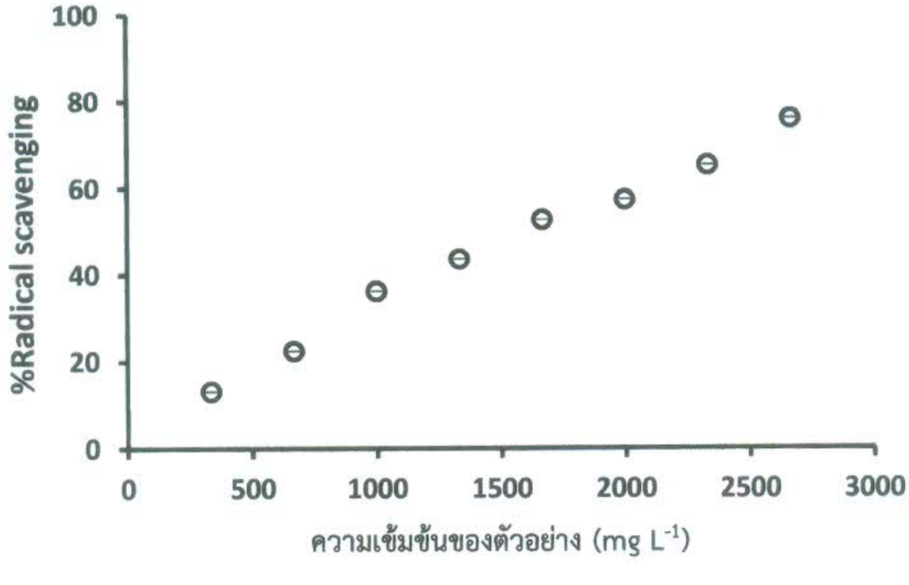


รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน

4.3.3 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน

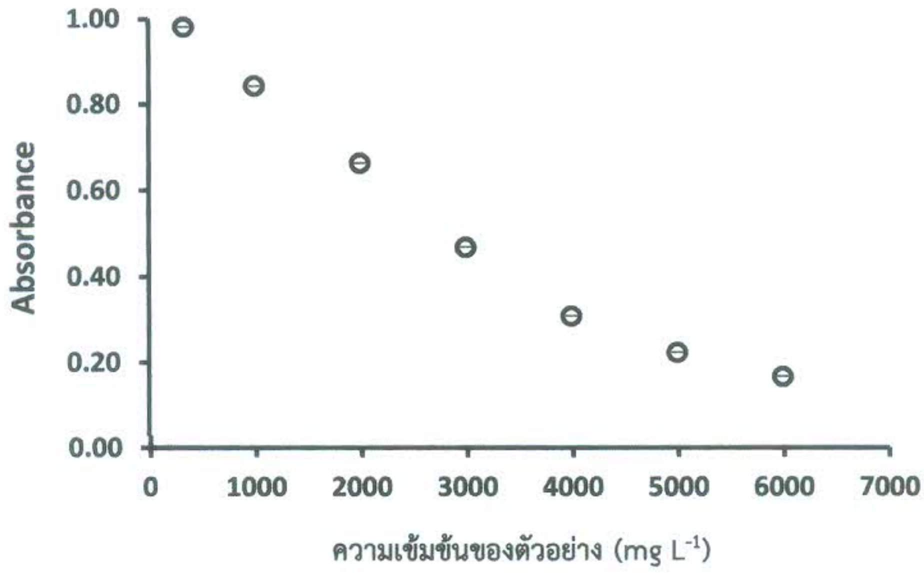


รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน จากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน

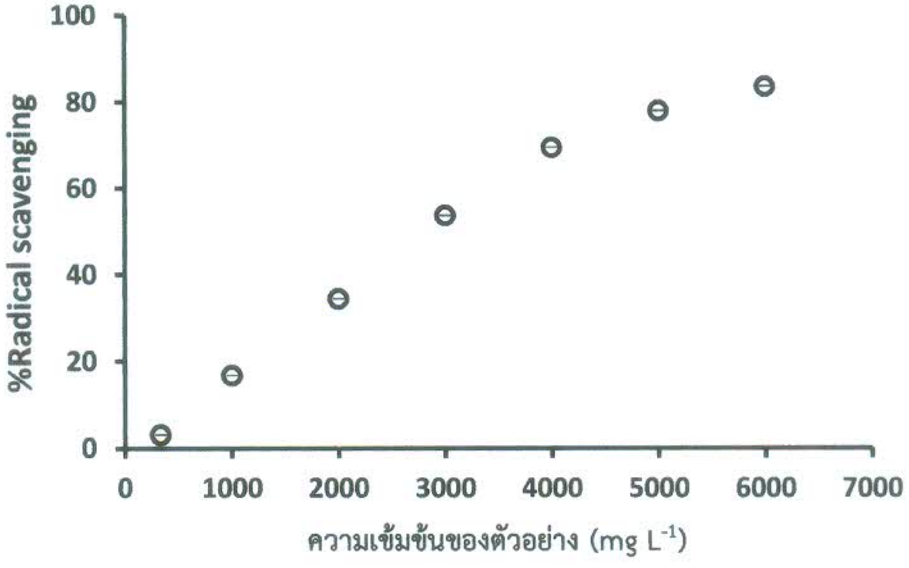


รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน

4.3.4 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน

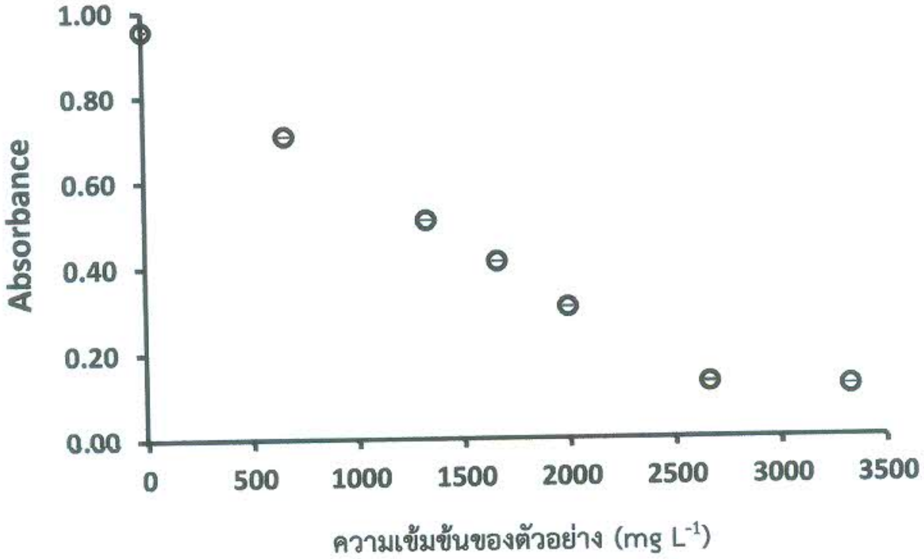


รูปที่ 4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน จากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน

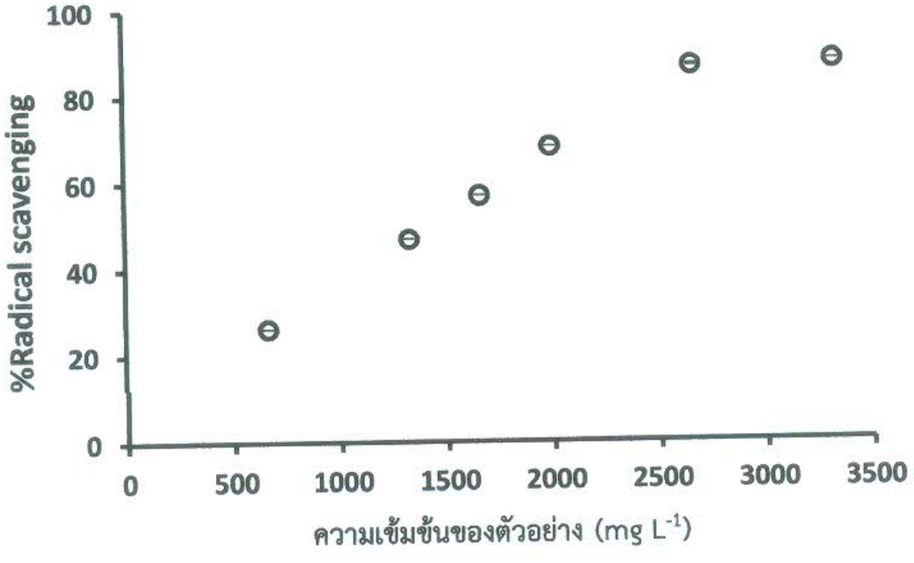


รูปที่ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน

4.3.5 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน

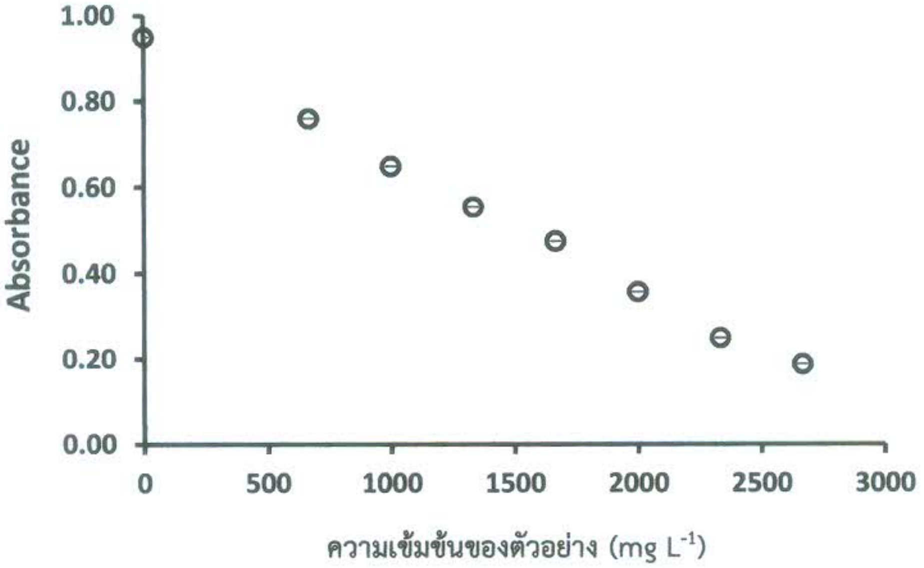


รูปที่ 4.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน

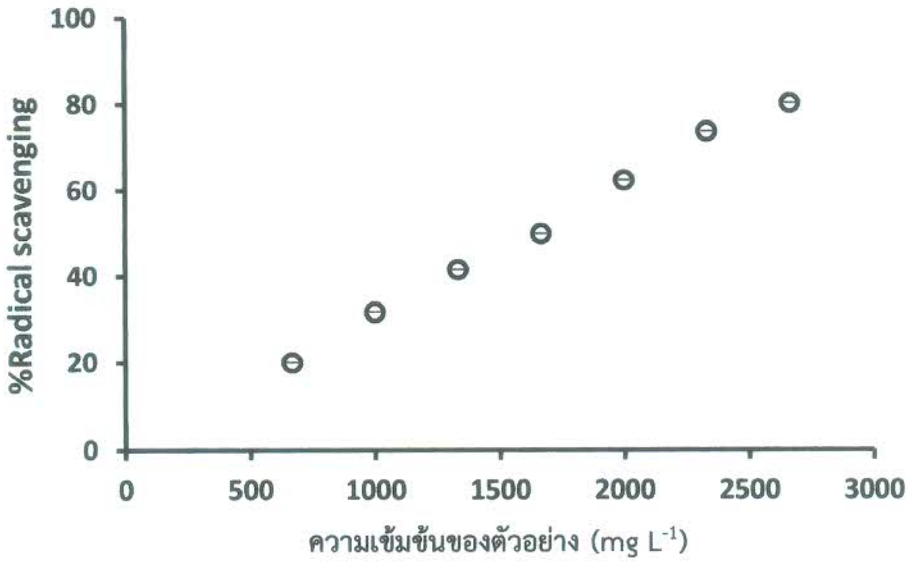


รูปที่ 4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน

4.3.6 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน

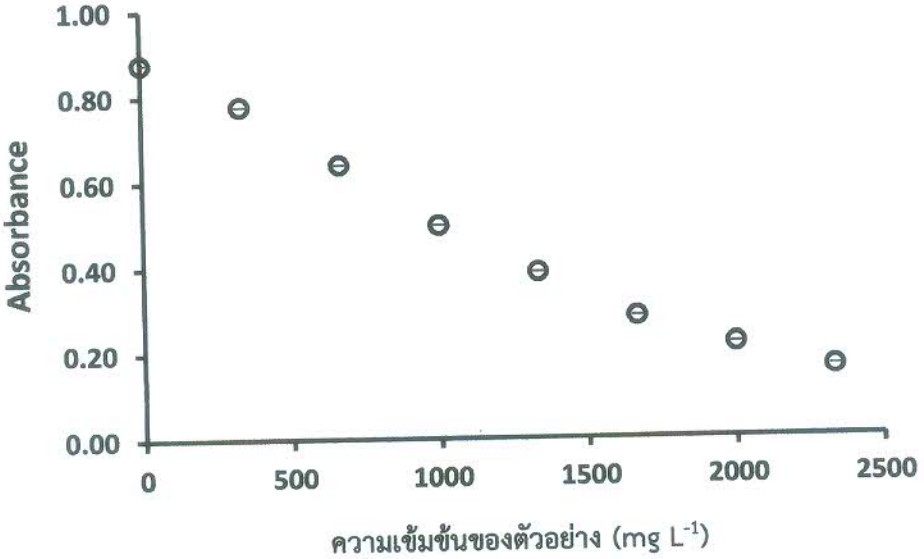


รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน

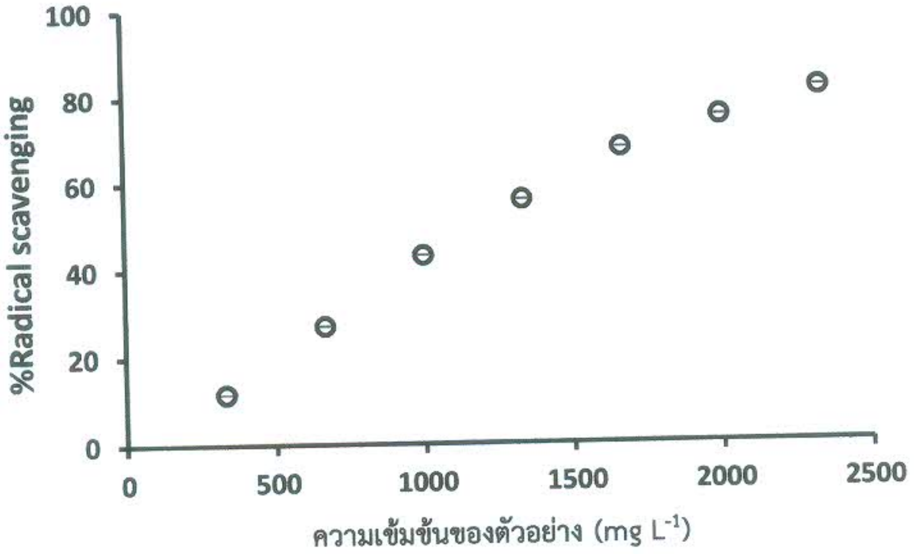


รูปที่ 4.14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน

4.3.7 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน

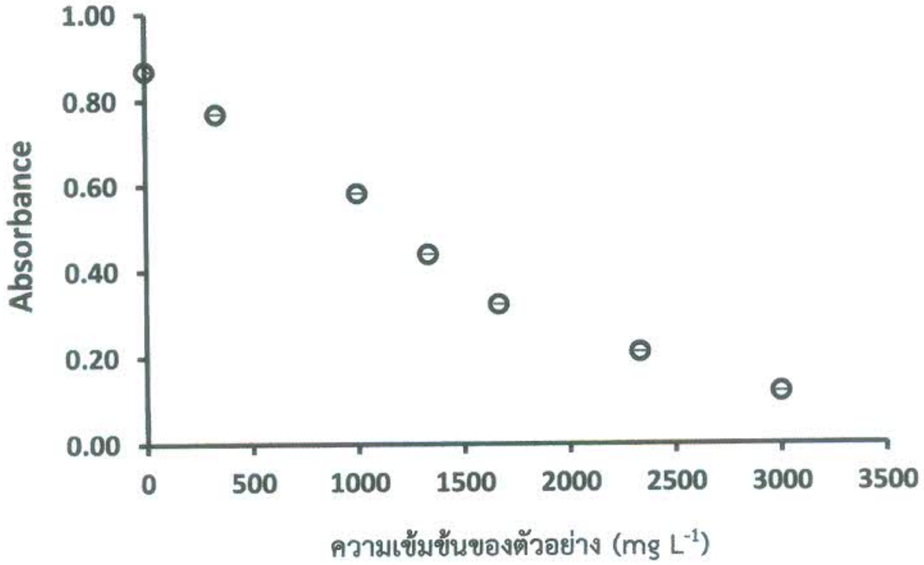


รูปที่ 4.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน

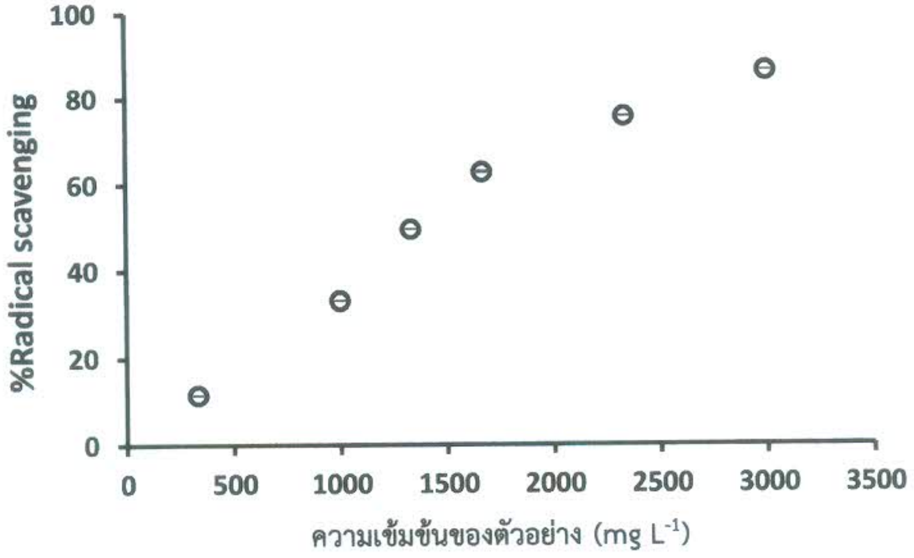


รูปที่ 4.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน

4.3.8 ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 3 อายุ 11 วัน

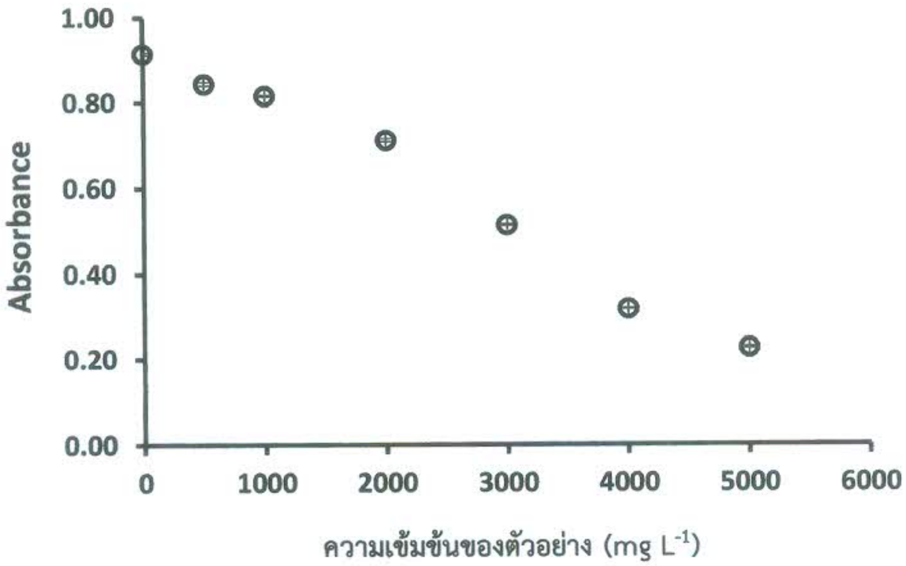


รูปที่ 4.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน

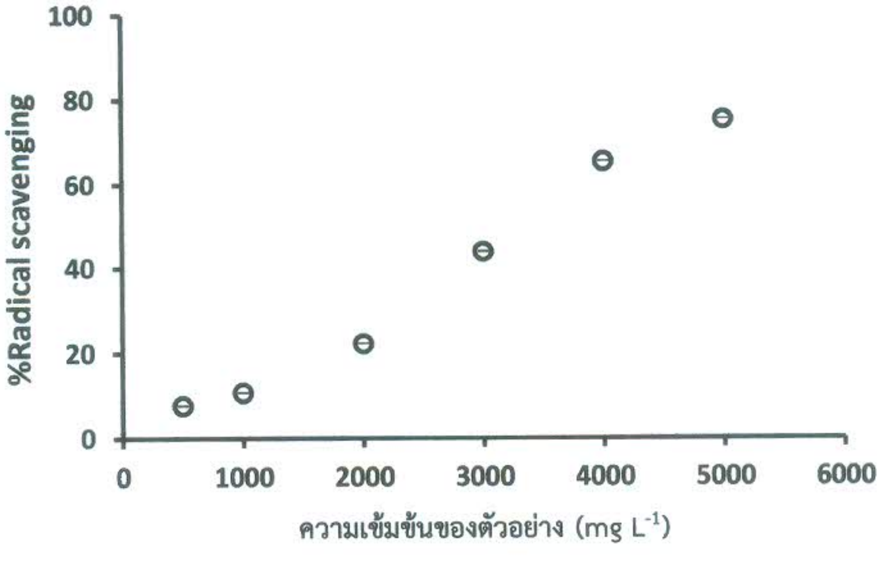


รูปที่ 4.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน

4.3.9 ต้นอ่อนทานตะวันจากตลาด อำเภอเมือง จ. ลพบุรี



รูปที่ 4.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากตลาดอำเภอเมืองลพบุรี จังหวัดลพบุรี



รูปที่ 4.20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับความเข้มข้นของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากจากตลาดอำเภอเมืองลพบุรี จังหวัดลพบุรี

4.4 เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การจากวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารแล้วคำนวณค่า %radical scavenging และจากการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %radical scavenging กับค่าความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน (รูปที่ 4,3-4.20) แล้วคำนวณค่า IC_{50} ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า IC_{50} ของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน

ตัวอย่าง	IC_{50} (mg L^{-1})
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน	1,250.78
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน	965.99
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน	1,734.42
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน	2,879.96
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน	1,753.49
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน	1,512.87
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน	1,178.97
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน	1,347.51
ต้นอ่อนทานตะวันจากตลาด อ. เมืองลพบุรี	3,281.96

จากข้อมูลในตาราง เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 พบว่า ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 7 วัน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดรองลงมาคือ ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 5 วัน อายุ 9 วัน และ 11 วัน ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 พบว่า ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 9 วัน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดรองลงมาคือ ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 7 วัน อายุ 5 วัน และ 11 วัน ตามลำดับ

ส่วนต้นอ่อนทานตะวันที่ซื้อจากตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด อาจเกิดจากการเก็บเกี่ยวไว้เป็นเวลานาน หรือวิธีการปลูกที่แตกต่างกัน

และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือค่า ascorbic acid equivalent (AAE) โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ ascorbic acid และค่า %radical scavenging ความยาวคลื่น 517 nm และหาสมการเส้นตรง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสาร

ตัวอย่างคำนวณเป็นค่า %radical scavenging นำไปแทนค่าในสมการเส้นตรงจะได้ค่า ascorbic equivalent ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า AAE ของตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวัน

ตัวอย่าง	**ความเข้มข้นของตัวอย่าง** ($mg\ L^{-1}$)	AAE ($mg\ L^{-1}$)
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 5 วัน	1000	5.15
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 7 วัน	1000	5.70
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 9 วัน	1000	4.23
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 1 อายุ 11 วัน	1000	2.42
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 5 วัน	1000	4.24
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 7 วัน	1000	3.82
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 9 วัน	1000	4.88
ต้นอ่อนทานตะวันแหล่งเพาะที่ 2 อายุ 11 วัน	1000	3.94
ต้นอ่อนทานตะวันจากตลาด อ. เมืองลพบุรี	1000	1.86

จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าควรเก็บเกี่ยวต้นอ่อนทานตะวันที่มีอายุไม่เกิน 9 วัน เพื่อให้ได้ผักที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งโดยปกติแล้วผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวันมักจะเก็บเกี่ยวผลผลิตต้นอ่อนทานตะวันเมื่ออายุ 7 วัน เนื่องจากขนาดต้นและรสชาติเหมาะแก่การนำไปรับประทานมากที่สุด ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าต้นอ่อนทานตะวันที่บริโภคโดยทั่วไปจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง มีค่า IC_{50} ประมาณ 1000 - 1500 $mg\ L^{-1}$

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันที่ใช้เวลาในการเพาะต่างกัน โดยนำตัวอย่างมาจากผู้ผลิตและจำหน่ายต้นอ่อนทานตะวันในเขตจังหวัดลพบุรี 2 แหล่ง โดยแต่ละแหล่งเพาะต้นอ่อนทานตะวันอายุ 5 วัน 7 วัน 9 วัน และ 11 วัน โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดโดยใช้เมทานอลแล้ว มาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ และศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 517 nm แล้วนำมาคำนวณเป็นค่า % radical scavenging และค่า IC_{50} และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid equivalent, AAE)

จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 965.99 - 3,281.96 mg L^{-1} โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1 พบว่า ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 7 วัน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดรองลงมาคือ ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 5 วัน อายุ 9 วัน และ 11 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2 พบว่า ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 9 วัน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดรองลงมาคือ ต้นอ่อนทานตะวันอายุ 7 วัน อายุ 5 วัน และ 11 วัน ตามลำดับ ส่วนต้นอ่อนทานตะวันที่ซื้อจากตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด

และเมื่อเปรียบเทียบค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก (AAE) พบว่า ต้นอ่อนทานตะวัน 1000 mg L^{-1} มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1.76 - 5.70 mg L^{-1}

ควรเก็บเกี่ยวต้นอ่อนทานตะวันที่มีอายุไม่เกิน 9 วัน เพื่อให้ได้ผักที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งโดยปกติแล้วผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวันมักจะเก็บเกี่ยวผลผลิตต้นอ่อนทานตะวันเมื่ออายุ 7 วัน เนื่องจากขนาดต้นและรสชาติเหมาะแก่การนำไปรับประทานมากที่สุด ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าต้นอ่อนทานตะวันที่บริโภคโดยทั่วไปจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของรักชนก ภูวพัฒน์ และคณะ (2559) ซึ่งได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของใบและลำต้นอ่อนทานตะวันอายุ 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าทั้งใบและลำต้นอ่อนทานตะวันอายุ 1 และ 2 สัปดาห์ มีสารประกอบฟีนอล จึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ดังนั้นจึงควรส่งเสริมให้มีการผลิตและบริโภคต้นอ่อนทานตะวันต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวัน เช่น อุณหภูมิที่ใช้เก็บตัวอย่าง ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างก่อนนำไปบริโภค

5.5.2 ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของพืช ผักชนิดอื่น ๆ ที่เป็นที่นิยมบริโภคในท้องถิ่น จังหวัดลพบุรีเพื่อให้เห็นคุณค่าของผักในท้องถิ่นและเป็นการส่งเสริมให้ผลิตและบริโภคผักมากขึ้น

บรรณานุกรม

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา**. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์, 1(1): 59-70.

ไชยรัตน์ ส้มฉุน (2557). **ทานตะวันอ่อน สู้แล้ง ใช้น้ำน้อย 7 วัน นับเงิน**. ไทยรัฐออนไลน์. เข้าถึงได้จาก < http://www.thairath.co.th/content/402884>

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี, จัตุพล กันทะมูล, ภัทราภรณ์ โตวัฒนกิจ, วชิรวิทย์, วงศ์ษารัฐ, วนิดา ใจหมั่น, นิภาพร เมืองจันทร์ และ สุภารัตน์ จันทร์เหลืองใ (2554). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง**. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ, 6(3): 195-201.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์ (2556). **อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 21(3): 275-286.

ประวิทย์ สันติวัฒนา และจิตตินันท์ ปานประไพ (2559). **การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม มะเขือเทศ และงาดำ น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม มะเขือเทศ และงาดำ**. วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ 15(1): 1-13.

รักชนก ภูวพัฒน์, มูฮัมมัดบาคอรี ยูโซ๊ะ, โซเฟีย เมฆารัฐ. (2559). **การศึกษาอายุที่เหมาะสมของต้นอ่อนทานตะวันต่อความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ** .วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ปีที่ 8 ฉบับที่ 1, 90 – 100.

สุกัญญา เขียวสะอาด (2555). **กะเพรากับการต้านอนุมูลอิสระ**. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง, 21 (2):54-65.

สุชาวลีวรรณ ตรีเสิน และ ชนิกาญจน์ จันทร์มาทอง, (2559). **ผลของการแช่เมล็ดด้วยกรดซาลิซิลิกต่อความงอกของเมล็ด การเจริญเติบโต และศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของต้นอ่อนทานตะวัน**.วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (III), 10-16.

สำนักงานเกษตรจังหวัดลพบุรี. 2556. เข้าถึงได้จาก < http://www.lopburi.doae.go.th/index1.htm> 22 พฤษภาคม 2560.

Bast, A., Haenen, G. R. M. M., and Doelman, C. J. A. (1991). **Oxidants and antioxidants: State of the art**. American Journal of Medicine 91.

Ceccarini, L., Macchia, M., Flamini, G., Cioni, P.L., Caponi, C. &Morelli, I. (2004). **Essential Oil composition of Helianthus annuus L. leaves and heads of two cultivated hybrids “Carlos” and “Florom, 350**, Industrial crops and products, 19, 13-17.

Dwivedi, A., Sharma, G.N. &Kaushik, A.Y. (2015). **Evaluation of Helianthus annuus L. leaves extract for the antidiarrheal and antihistaminic activity**. International journal research inayurveda and pharmacy, 6(1), 118-123.

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., and Chun, O. K. (2011). **Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods**. Journal of Food Composition and Analysis 24, 1043-1048.

Gressier, B., Lebegue, S., Brunet, C., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M., and Cazin, J. C. (1994). **Pro-oxidant properties of methotrexate: Evaluation and prevention by an anti-oxidant drug**. Pharmazie 49, 679-681.

Halliwell, B. (1994). **Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?** The Lancet 344, 721-724.

Halliwell, B. (1999). **Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning)**. Free Radical Research **31**, 261-272.

Halliwell, B. (2009). **The wanderings of a free radical**. Free Radical Biology and Medicine 46, 531-542.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., and Aruoma, O. I. (1995). **The characterization of antioxidants**. Food and Chemical Toxicology 33, 601-617.

Ismail, A., Marjan, Z. M., and Foong, C. W. (2004). **Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables**. Food Chemistry 87, 581-586.

Jabbari, M., and Jabbari, A. (2016). **Antioxidant potential and DPPH radical scavenging kinetics of water-insoluble flavonoid naringenin in aqueous solution of micelles**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 489, 392-399.

Lee, V. S. Y., Chen, C. R., Liao, Y. W., Tzen, J. T. C., and Chang, C. I. (2008). **Structural determination and DPPH radical-scavenging activity of two acylated flavonoid tetraglycosides in oolong tea (Camellia sinensis)**. Chemical and Pharmaceutical Bulletin **56**, 851-853.

Moon, J. K., and Shibamoto, T. (2009). **Antioxidant assays for plant and food components**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 1655-1666.

Mrazek, N., Watla-iad, K., Deachathai, S., and Suteerapataranon, S. (2012). **Rapid antioxidant capacity screening in herbal extracts using a simple flow injection-spectrophotometric system**. Food Chemistry 132, 544-548.

Podsędek, A. (2007). **Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review**. LWT - Food Science and Technology 40, 1-11.

Pokorny, Yanishlieva., N., and Gordon, M. (2001). **"Antioxidants in Food: Practical Applications,"** CRC Press, New York, p 380.

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.

Scott DA, Poston RN, Wilson RF, Coward PY, Palmer RM. (2005). **“The in-fluence of vitamin**

C on systemic markers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non-smokers”. Journal of Inflammation Research 54: 138–144.

Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., and Tarantilis, P. A. (2014). **Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants**. Industrial Crops and Products 53, 46-54.

Stratil, P., Klejdus, B., and Kubáň, V. (2006). **Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 607-616.

Toit, R., Volsteedt, Y., and Apostolides, Z. (2001). **Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents.** Toxicology 166, 63-69.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Mark, T.D., Cronin, M.T.D., Milan Mazur, M. and Telser, J., 2007. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. Int. J. Biochem. Cell Biol., 39(1), 44–84.

Wootton-Beard, P. C., Moran, A., and Ryan, L. (2011). **Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods.** Food Research International **44**, 217-224

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาพตัวอย่างและภาพเครื่องมือ

ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 1

5 วัน **7 วัน** **9 วัน** **11 วัน**

ตัวอย่างต้นอ่อนทานตะวันจากแหล่งเพาะที่ 2

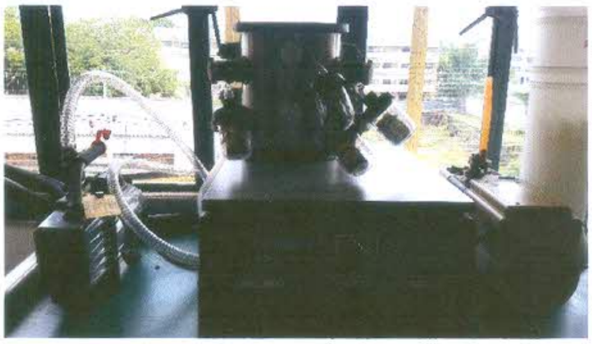
5 วัน **7 วัน** **9 วัน** **11 วัน**

รูปที่ ก1 ต้นอ่อนทานตะวัน

รูปที่ ก2 เครื่อง UV-Vis spectrophotometer

รูปที่ ก3 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator)

รูปที่ ก4 เครื่องเขย่าสาร (Shaker)



รูปที่ ก5 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)

รูปที่ ก6 ตัวอย่างสารสกัดแห้ง

รูปที่ ก7 DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

รูปที่ ก8 สารละลาย DPPH

รูปที่ ก9 ศึกษาวิธีการผลิตและจำหน่ายต้นอ่อนทานตะวัน จากผู้ผลิตต้นอ่อนทานตะวันในจังหวัด
ลพบุรี

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)	ดร. ปิยวรรณ พันสี
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)	Dr. Piyawan Phansi
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์ สาขาวิชาเคมี (ค.บ.) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี
หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้	สาขาวิชาเคมี (ค.บ.) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี 321 ต.ทะเลชุบศร อ.เมือง จ. ลพบุรี 1500 โทรศัพท์ 083-1870971 อีเมลล์ pphansi@gmail.com
ประวัติการศึกษา	2552 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเคมี (เกียรตินิยมอันดับ2) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2558 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์ มหาวิทยาลัยมหิดล
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ	การวิเคราะห์ด้วยระบบการไหลแบบอัตโนมัติ การวิเคราะห์ของไหลระดับจุลภาคบนกระดาษ