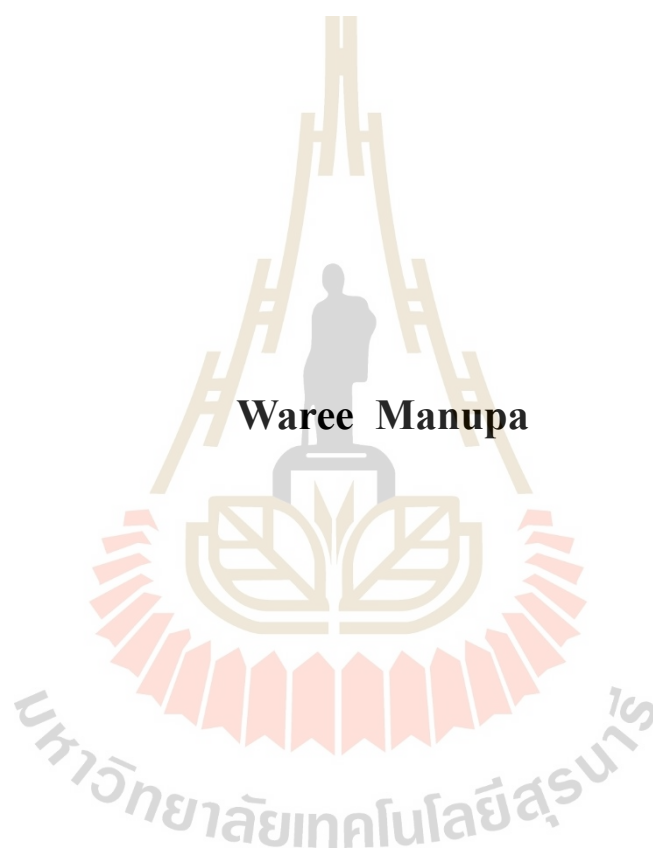


ความคงตัว และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของลูทีนที่สกัดได้จากรังไหมเหลือ
พันธุ์ไทยพื้นบ้าน (*Bombyx mori*)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2557

**STABILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF
LUTEIN EXTRACTED FROM THAI NATIVE
SILK COCOONS (*BOMBYX MORI*)**

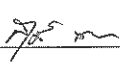


**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Food Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2014**

ความคงตัว และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของลูทีนที่สกัดได้จากรังไหมเหลือ
พันธุ์ไทยพื้นบ้าน (*Bombyx mori*)

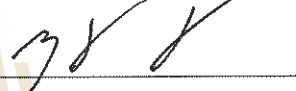
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผศ. ดร.สุรนันทา ทองทา)

ประธานกรรมการ



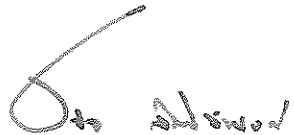
(รศ. ดร.มานิชญ์ สุธีพัฒนานนท์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



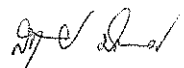
(ผศ. ดร.นันท์ทิพ ลิ้มเพียรชอบ)

กรรมการ



(ศ. ดร.ชูกิจ ลิ้มปิงานงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม



(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

วาริ มะนุภา : ความคงตัว และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของลูทีนที่สกัดได้จากรังไหมเหลือ
พันธุ์ไทยพื้นบ้าน (*Bombyx mori*) (STABILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES
OF LUTEIN EXTRACTED FROM THAI NATIVE SILK COCOONS (*Bombyx mori*)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุธีรพัฒนานนท์, 112 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณของสารสกัดลูทีนในรังไหมเหลือพันธุ์พื้นบ้าน 5 สายพันธุ์ รวมทั้งศึกษาความคงตัว และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือจากการศึกษาพบว่า รังไหมสายพันธุ์สำโรงให้ผลผลิตมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 0.050 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสายพันธุ์นางลาย นางน้อยและนางสีว และนางคู่มีร้อยละของผลผลิตน้อยที่สุด ซึ่งมีผลผลิตเท่ากับร้อยละ 0.047 0.042 0.041 และ 0.038 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การศึกษาความคงตัวของสารสกัดลูทีนพบว่า ความร้อนและแสงสว่างเป็นปัจจัยหลักต่อการสลายตัวของลูทีน และลูทีนจากรังไหมเหลือทั้ง 5 สายพันธุ์มีความคงตัวมากกว่าลูทีนทางการค้า โดยสภาวะที่ดีที่สุดในการเก็บรักษาสารสกัดลูทีน คือที่อุณหภูมิ -80 และ -20 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนและแสงสว่าง การสลายตัวของลูทีนในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 ถึง 4 องศาเซลเซียส เป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่งแบบมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสองช่วง นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินอีช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้มากกว่าร้อยละ 25 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอี จากการแยกองค์ประกอบของลูทีนจากรังไหมเหลือด้วย TLC พบว่า สารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือทั้ง 5 สายพันธุ์มีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งคาดว่าองค์ประกอบดังกล่าว คือเร็กซ์ และสารในกลุ่มฟีนอลิก จากการแยกสารสกัดหยาบลูทีนจากรังไหมเหลือพันธุ์นางน้อยด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนพบว่า สามารถสกัดแยกลูทีนให้มีความบริสุทธิ์สูงได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานแซนโทฟิลล์ การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และเอบีทีเอสได้ดีกว่าลูทีนทางการค้า และบีเอชเอ นอกจากนี้ลูทีนจากรังไหมเหลือยังมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ ได้ดีกว่าลูทีนทางการค้าวิตามินซีและวิตามินอีอีกด้วย จากการหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดพบว่าลูทีนจากรังไหมเหลือมีปริมาณสารดังกล่าวมากกว่าลูทีนทางการค้า โดยรังไหมเหลือพันธุ์นางน้อยมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุดรองลงมาคือ พันธุ์สำโรง นางสีว นางคู่ และนางลาย ตามลำดับ ดังนั้นรังไหมเหลือจึงเป็นแหล่งใหม่ของลูทีนที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมและผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางยา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา _____ วาริ มะนุภา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

WAREE MANUPA : STABILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES
OF LUTEIN EXTRACTED FROM THAI NATIVE SILK COCOONS
(*Bombyx mori*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MANOTE
SUTHEERAWATTANANONDA, Ph.D., 112 PP.

LUTEIN/YELLOW SILK COCOONS/*Bombyx mori*/STABILITY/ANTIOXIDANT
ACTIVITIES

The purpose of this study was to extract silk lutein from five varieties of the cocoons of Thai silkworms, analyze their lutein content, antioxidant activity, and stability. Among the five yellow silk cocoon strains, the Sumrong strain had the highest lutein yield (0.050%) followed by Nang Lai (0.047%), Nang Noi (0.042%), Nang Sew (0.041%), and lastly, Nang Tui (0.038%). In the study, these five strains of silk lutein were found to be more stable than the commercial lutein. Further, it was established that their optimum storage conditions were -80 and -20°C in an opaque container in the absence of oxygen. Degradation of lutein between -80 to 4°C correlated well with the two-stage first-order kinetics. This indicated that lutein was susceptible to heat and light. However, vitamin E was able to retard the degradation of lutein by about 25% as compared with no vitamin E. Results from thin-layer chromatography suggested that lutein extracts obtained from five strains of *Bombyx mori* cocoons were similar in composition. Most likely, they contained wax and phenolic compounds. The partition of crude lutein extracted from Nang Noi was separated into high purity lutein similar to standard xanthophyll. In the assessment of antioxidant activity, the study found that silk lutein extract was a better scavenger of ABTS and DPPH than commercial lutein and

BHA. Moreover, silk lutein was found to be more effective than commercial lutein, vitamin C, and α -tocopherol in the reduction of the Fe^{3+} -TPTZ complex. From the analysis of total phenolic content, silk lutein had higher phenolic content than commercial lutein. Among the five varieties of *Bombyx mori* cocoons, Nang Noi showed the highest phenolic content, followed by Samrong, Nang Sew, Nang Tui and Nang Lai, respectively. Therefore, it is noteworthy that yellow silkworm cocoons can be a potential novel source of lutein for food supplements and nutraceutical products.



School of Food Technology

Academic Year 2014

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

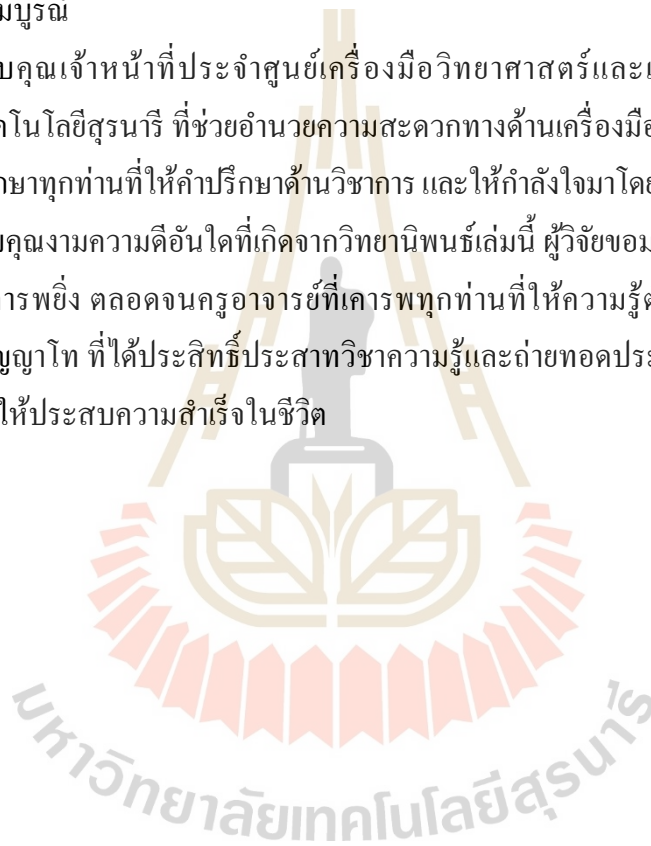
กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.มาโนชญ์ สุนธิ์พัฒนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหา และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 3 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องและอุปกรณ์ ขอขอบคุณพี่น้องบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ให้ความรู้ตั้งแต่ระดับประถมศึกษา จนถึงระดับปริญญาโท ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

วารี มะนุภา



สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 สมมติฐานของการวิจัย	5
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น	5
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
2 ทัศนวิสัยการมองเห็นและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ลูทีน.....	6
2.1.1 โครงสร้างทางเคมี	6
2.1.2 แหล่งที่พบและปริมาณลูทีน.....	7
2.2 ความสำคัญของลูทีน	9
2.2.1 คุณสมบัติการป้องกันโรคตา	9
2.2.1.1 คุณสมบัติการกรองแสงสีน้ำเงิน (blue light).....	10
2.2.1.2 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในจอประสาทตา.....	11
2.2.1.3 ลดความเสี่ยงและชะลอโรคจอประสาทตาเสื่อม	12
2.2.1.4 ลดความเสี่ยงและชะลอโรคต้อกระจก	14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response).....	16
2.2.3 การลดการอักเสบ (inflammation).....	16
2.2.4 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง.....	17
2.2.5 ลดความเสี่ยงโรคเบาหวาน.....	18
2.3 ความคงตัวของลูทีน	19
2.4 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	21
3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	24
3.1.1 รังไหม	24
3.1.2 การสกัดลูทีน และการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC.....	24
3.1.3 ผลของอนุมูลอิสระและแสงสว่างต่อความคงตัวของสารสกัดลูทีน และการแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือง โดยวิธี TLC.....	24
3.2 วิธีการทดลอง	25
3.2.1 การหาปริมาณลูทีนที่เป็นองค์ประกอบในรังไหมเหลืองจากรังไหม เหลือง 5 สายพันธุ์ คือ นางน้อย นางล้วน นางตุ้ย นางลาย และลำโรง.....	25
3.2.1.1 การสกัดแยกลูทีนจากส่วนของรังไหมที่ผ่านการลอกกาไหม แล้ว (Patent No. WO 2012/091683 A1).....	25
3.2.1.2 การสกัดแยกลูทีนจากส่วนของสารละลายโปรตีนซีรีซิน	25
3.2.1.3 การหาปริมาณของสารสกัดลูทีนทั้งหมดจากรังไหมเหลือง ด้วยวิธี HPLC	26
3.2.2 ผลของอนุมูลอิสระและแสงสว่างต่อความคงตัวของสารสกัดลูทีน	26
3.2.2.1 การทดสอบความคงตัวของลูทีน	26
3.2.2.2 การศึกษาผลของปริมาณวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีน	27
3.2.2.3 การหาปริมาณของลูทีนหลังการเก็บรักษา	27
3.2.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำ ละลายแบบแบ่งส่วน (partition).....	28

สารบัญ (ต่อ)

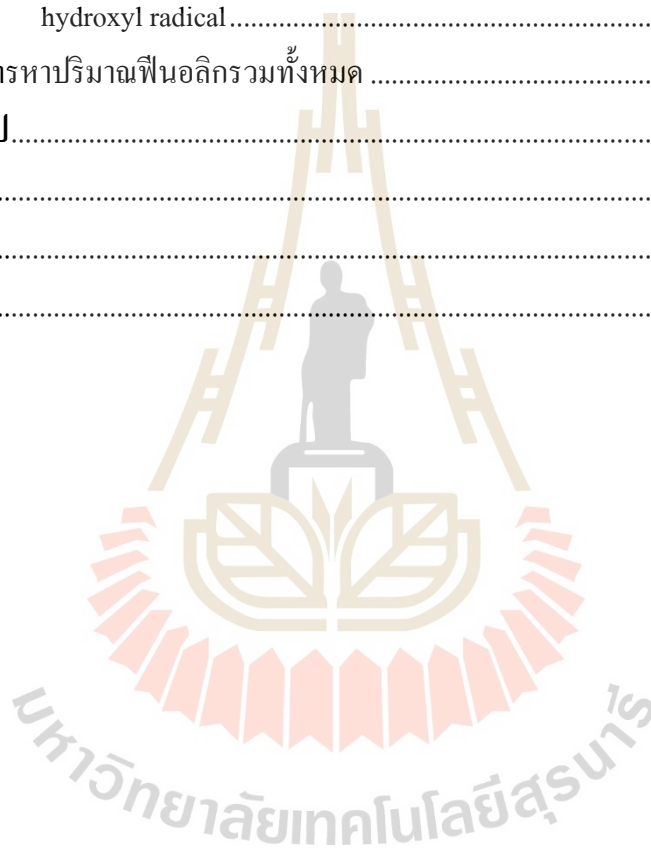
หน้า

3.2.4 การแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดยวิธี	
Thin layer chromatography (TLC)	28
3.2.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	28
3.2.5.1 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	28
3.2.5.2 วิธี Metal chelating activity assay	29
3.2.5.3 วิธี Scavenging activity of ABTS radical cation	29
3.2.5.4 วิธี Scavenging activity of DPPH radical.....	30
3.2.5.5 วิธี Scavenging activity of Hydroxyl radical.....	30
3.2.6 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด (total phenolics)	31
3.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	31
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	32
4.1 ผลของการหาปริมาณลูทีนทั้งหมดจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ คือ	
นางน้อย นางสีว นางคู่ย นางลาย และสำโรง.....	32
4.2 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือง	33
4.2.1 ผลของอุณหภูมิ และแสงสว่างต่อความคงตัวของลูทีนจากต่างสายพันธุ์	33
4.2.2 การศึกษาการศึกษาคงตัวของลูทีนจากต่างสายพันธุ์	42
4.2.3 การศึกษาผลของการเติมวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีน	51
4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย	
แบบแบ่งส่วน	66
4.4 การแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดย thin layer	
chromatography (TLC)	70
4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	72
4.5.1 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant	
power (FRAP).....	72
4.5.2 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Metal chelating activity assay	74
4.5.3 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity	76

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.4 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging activity of DPPH radical	78
4.5.5 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging activity of hydroxyl radical	80
4.6 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด	82
5 บทสรุป	84
รายการอ้างอิง	86
ภาคผนวก.....	102
ประวัติผู้เขียน.....	112



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของลูทีนจากแหล่งต่าง ๆ	8
2.2 การศึกษาผลของปริมาณลูทีนต่อการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่อกระดูก	15
2.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในน้ำมันที่สกัดจากจากเมล็ดมัสตาร์ดที่ผ่าน (RMSO)และไม่ผ่านการคั่ว (URMSO) ในระหว่างการทำปฏิกิริยากับ ออกซิเจน (oxidation) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	20
2.4 การประเมินจลนพลศาสตร์ทางความร้อนของลูทีนในผงข้าวโพดหวาน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ	21
2.5 EC 50 ของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของลูทีนจากดอก เดย์ลิลลี สารมาตรฐานลูทีน สารมาตรฐานซีแซนทีน และสารมาตรฐานอ้างอิง	23
4.1 ความเข้มข้นของลูทีนทั้งหมดในสารสกัดจากรังไหมเหลืองที่ผ่านการลอกขาวไหม และสารละลายโปรตีนซีรีซินที่ได้จากขั้นตอนการลอกขาวไหมจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์	33
4.2 เวลาครึ่งชีวิต พลังงานก่อกัมมันต์ และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณลูทีนและสภาวะการเก็บที่สภาวะแตกต่างกัน	47
4.3 ผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดจากรังไหมเหลือง และลูทีนทางการค้าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ	55
4.4 ผลของปริมาณวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	58
4.5 ความคงตัวของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูทีนตามท้องตลาด	61
4.6 เวลาครึ่งชีวิต และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทีน ผสมวิตามินอี และสภาวะการเก็บแตกต่างกัน	63
4.7 ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ลดลงร้อยละ 50 ของลูทีน จากรังไหมเหลือง ลูทีนทางการค้าและสารมาตรฐานอ้างอิง	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

4.8	ค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระเอปียีเอสลดลงร้อยละ 50 ของลูทีน จากรังไหมเหลืองลูทีนทางการค้า และสารมาตรฐานอ้างอิง.....	77
4.9	ค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระดีพีพีเอสลดลงร้อยละ 50 ของลูทีน จากรังไหมเหลือง ลูทีนทางการค้าและสารมาตรฐานอ้างอิง.....	79
4.10	ปริมาณฟีนอลิกรวมของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลือง.....	83
ผ1	ผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัด จากรังไหมเหลืองที่ผ่านการทำแห้งและเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	104
ผ2	ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในที่มีด.....	107
ผ3	ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในที่มีด.....	108
ผ4	ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด.....	109
ผ5	ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีด.....	110



สารบัญรูปภาพ

ภาพที่

หน้า

1.1	ลักษณะของตัวไหม และรังไหมพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	2
2.1	โครงสร้างของแคโรทีนอยด์	7
2.2	ภาพจากเนื้อเยื่อบริเวณโพวีย์ของลิง (A) และมนุษย์ (B) ที่แสดงถึงการกระจาย ตัวของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์บริเวณจุดกลางรับภาพของจอประสาทตา	10
2.3	สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของลูทีน	11
2.4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในจอประสาทตาโดยใช้เทคนิครามาน สเปกโตรสโกปี (Raman spectroscopy) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคจอประสาทตาที่ได้รับ ลูทีนในระดับความเข้มข้นสูง (≥ 4 มิลลิกรัมต่อวัน) และไม่ได้รับลูทีนเป็น อาหารเสริมหรือได้รับในระดับความเข้มข้นต่ำ (275 ไมโครกรัมต่อวัน).....	14
2.5	ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของลูทีนจากดอกเคย์ลิลี่ และสารมาตรฐานโทรลือกซ์.....	22
4.1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนทางการค้าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	37
4.2	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากรังไหมสายพันธุ์นางน้อยเมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิต่าง ๆ	37
4.3	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากรังไหมสายพันธุ์นางดู่เมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิต่าง ๆ	38
4.4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากรังไหมสายพันธุ์นางสาวเมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิต่าง ๆ	38
4.5	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากรังไหมสายพันธุ์นางลายเมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิต่าง ๆ	39
4.6	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากรังไหมสายพันธุ์ตำโรงเมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิต่าง ๆ	39
4.7	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส	40
4.8	การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	40

สารบัญรูปลภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	41
4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	41
4.11 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของเบต้าแคโรทีนหลังจากทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ.....	44
4.12 กลไกการต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์เสริมกันของแคโรทีนอยด์ วิตามินอี และวิตามินซี	54
4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางลายที่ผสมวิตามินอี 5 เท่า เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในที่มีดและปราศจากออกซิเจน	62
4.14 พลังงานการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน	67
4.15 โคโรมาโตรแกรมของสารสกัดหยาบลูทีนจากรังไหมเหลือง (ก) และสารสกัดหยาบลูทีนที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนด้วยน้ำ (ข) เฮกเซน (ค) และไดคลอโรมีเทน (ง) จากการสแกนด้วยวิธี UV-Vis spectroscopy.....	68
4.16 การแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดยวิธี TLC (ข) เมื่อส่องดูภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ก).....	71
4.17 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของลูทีนและสารมาตรฐานอ้างอิง.....	75
4.18 สีของสารละลายหลังทำปฏิกิริยากับเฟอร์รัสคลอไรด์และเฟอร์โรซีน	75
4.19 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของตัวอย่างลูทีนที่ละลายในเอทานอล.....	81
4.20 สารผสมในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลก่อนการเติมกรดไทรคลอโรอะซิติก และกรดไทโอบาร์บิทรिक.....	81
4.21 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของตัวอย่างลูทีนที่ละลายในเฮกเซน	82
ผ1 กราฟสารมาตรฐานของลูทีน.....	103
ผ2 กราฟมาตรฐานเฟอร์รัส ซัลเฟต	111
ผ3 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก.....	111

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ABTS	=	2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
A_{control}	=	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม
$A_{\text{test sample}}$	=	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
BHA	=	Butylated hydroxyanisole
DMRT	=	Duncan's New Multiple Range Test
DPPH	=	2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
E_a	=	Activation energy
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	=	et alia (and others)
FRAP	=	Ferric reducing antioxidant power
g	=	Gram
GAE	=	Gallic acid
HPLC	=	High performance liquid chromatography
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
$\text{OH}\cdot$	=	Hydroxyl radical
R_f	=	ค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสาร
RT	=	อุณหภูมิห้อง
SD	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
TPTZ	=	2, 4, 6-Tripyridyl-s-triazine
Temp.	=	Temperature
vit E	=	Vitamin E
v/v/v	=	Volume : volume : volume
μg	=	Microgram
%	=	Percent

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไหมหม่อน (mulberry silkworm) หรือชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* L. เป็นไหมที่เกษตรกรไทยนิยมเลี้ยงกันมาก และใช้เป็นอาชีพในช่วงที่ว่างจากการทำนาและฤดูเก็บเกี่ยว เนื่องจากมีความทนทานต่อโรคและสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย สีของรังเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 1.1) เนื่องจากการดูดซึมแคโรทีนอยด์ (carotenoids) จากใบหม่อน และถูกส่งผ่านไปยังต่อมสร้างเส้นไหม (silk gland) โดยทางฮีโมลิมพ์ (hemolymph) (Zhao et al., 2008) แม้จะมีการเลี้ยงไหมเหลืองกันอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามรังไหมเหลืองก็มีขนาดเล็กกว่ารังไหมขาว ทำให้เส้นไหมดิบที่ได้มีปริมาณน้อยกว่า เป็นผลให้ไหมเหลืองมีราคาซื้อขายต่ำ อีกทั้งปริมาณการไหม (โปรตีนซีรีซิน) ที่ค่อนข้างสูงถือเป็นข้อด้อยอย่างหนึ่งของไหมเหลือง

ไหมเหลืองที่เป็นพันธุ์ไทยพื้นบ้าน และพันธุ์ไหมดั้งเดิมของไทยที่มีการอนุรักษ์สืบทอดกันมา รวมทั้งพันธุ์ไหมที่มีการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติดีขึ้น โดยมีการพัฒนาพันธุ์ในประเทศไทยที่ใช้เฉพาะพันธุ์ไหมไทยดั้งเดิมเป็นเชื้อพันธุ์เท่านั้น (สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ, 2549) เช่น

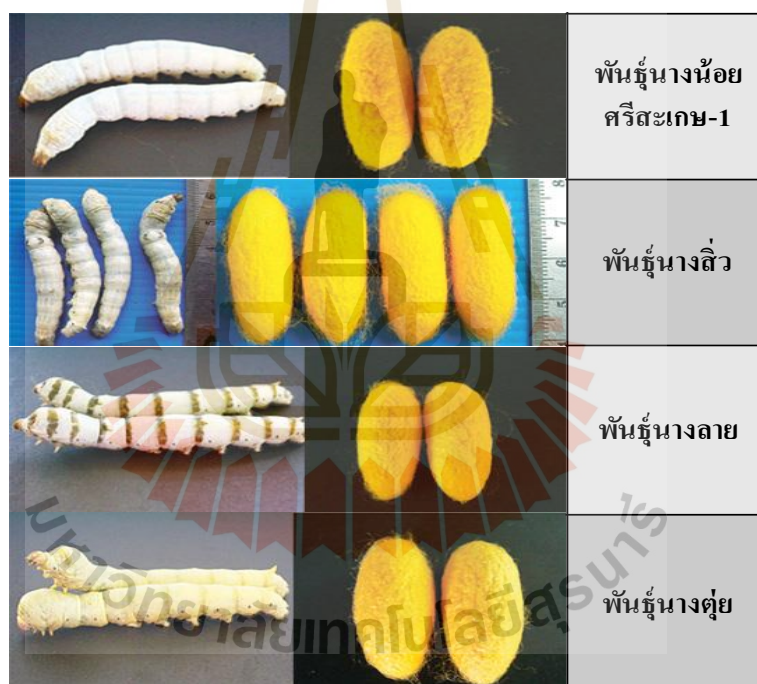
1. พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ-1 เป็นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านที่หนอนไหมมีสีขาวนวล รังไหมมีลักษณะสีเหลือง และหัวบ้านท้ายแหลม มีลักษณะเด่น คือ หนอนไหมแข็งแรง เลี้ยงง่าย เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศไทย และจำนวนไข่ไหมต่อแม่สูงกว่าพันธุ์พื้นเมืองที่เกษตรกรเลี้ยงอยู่เดิม (เฉลี่ย 348 ฟอง) อายุหนอนไหม 20 วัน ร้อยละดักแด้สมบูรณ์เท่ากับ 76-85 ร้อยละเปลือกรังเท่ากับ 11-13 และความยาวเส้นใยต่อรัง 312-410 เมตร ให้ผลผลิตรังไหมสดเฉลี่ย 10 กิโลกรัมต่อแผ่น (กรมหม่อนไหม, 2554)

2. พันธุ์นางลาย เป็นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านที่หนอนไหมมีลายขาวคาดดำตลอดลำตัว (ชาวบ้านจึงเรียกว่า “นางลาย” ตามลักษณะลำตัว) หนอนไหมแข็งแรง และเลี้ยงง่าย รังไหมมีลักษณะสีเหลือง หัวบ้านท้ายแหลม อายุหนอนไหม 20 วัน ร้อยละดักแด้สมบูรณ์เท่ากับ 84 ร้อยละเปลือกรังเท่ากับ 12 และมีความยาวเส้นใยต่อรัง 258-313 เมตร ให้ผลผลิตรังไหมสดเฉลี่ย 11 กิโลกรัมต่อแผ่น (กรมหม่อนไหม, 2554)

3. พันธุ์นางตุ้ย เป็นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านที่หนอนไหมมีสีเหลืองอมเขียว แข็งแรงและเลี้ยงง่าย รังไหมมีลักษณะสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม อายุหนอนไหม 21 วัน ร้อยละดักแด้สมบูรณ์เท่ากับ 86 ร้อยละเปลือกรังเท่ากับ 11 และความยาวเส้นใยต่อรัง 278 เมตร ให้ผลผลิตรังไหมสดเฉลี่ย 10 กิโลกรัม (กรมหม่อนไหม, 2554)

4. พันธุ์นางลิ้ว เป็นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านที่หนอนไหมมีลักษณะสีขาวอมเขียว แข็งแรงเลี้ยงง่าย รังไหมมีสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม อายุหนอนไหม 22 วัน ร้อยละดักแด้สมบูรณ์เท่ากับ 90 ร้อยละเปลือกรังเท่ากับ 11-12 และความยาวเส้นใยต่อรัง 372 เมตร (กรมหม่อนไหม, 2554)

5. พันธุ์ลำโรง (สุรินทร์) เป็นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านที่รังไหมมีสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม อายุหนอนไหม 23 วัน และมีร้อยละเปลือกรังเท่ากับ 11 (สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ, 2549)



ภาพที่ 1.1 ลักษณะของตัวไหม และรังไหมพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ต่าง ๆ

ที่มา: ดัดแปลงจากกรมหม่อนไหม, 2554

รังไหมซึ่งเป็นเส้นใยธรรมชาติใช้ทำเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่ม สิ่งทอต่าง ๆ นอกจากนั้นสารสกัดจากรังไหมสามารถใช้เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอาง อาหารเพื่อสุขภาพ ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ผ้าไหมไทยมีชื่อเสียงไปทั่วโลกในด้านความสวยงามและความเป็นเอกลักษณ์ เป็นสิ่งทอหลักที่นารายได้เข้าประเทศ การเลี้ยงไหมทำให้เกษตรกรมีอาชีพ

ที่สร้างรายได้สำหรับดำรงชีวิต ทำให้เกษตรกรไม่ละถิ่นฐานไปทำงานที่อื่น มีโอกาสในการสร้างครอบครัวและชุมชนที่เข้มแข็ง นอกจากนั้นไหมยังช่วยสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการภาคเอกชนที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมสิ่งทอ และการสร้างผลิตภัณฑ์จากไหม ปัจจุบันการส่งออกไหมและผลิตภัณฑ์ไหมของไทยมีแนวโน้มขยายตัวดีขึ้น เนื่องจากผู้บริโภคมีความนิยมในตัวสินค้าที่เป็นมิตรกับธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะคุณสมบัติของเส้นใยไหมที่เป็นโปรตีนซึ่งไม่ทำให้ระคายเคืองต่อผิวหนังเมื่อสวมใส่ แต่เนื่องจากไหมไทยพันธุ์พื้นบ้านมีปริมาณเส้นใยน้อย การแข่งขันทางการตลาดกับประเทศเพื่อนบ้านที่ผลิตไหมได้ในราคาที่ถูกลงกว่า จึงมีการพัฒนาปรับปรุงเป็นสายพันธุ์ไหมที่มีปริมาณเส้นไหมมากกว่าพันธุ์เดิม และให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์พื้นบ้านที่เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเลี้ยงไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านมีปริมาณน้อยลง องค์ความรู้ใหม่ ๆ ที่ได้จากการทำงานวิจัยทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากองค์ประกอบต่าง ๆ ของไหมเพื่อเพิ่มมูลค่าทำให้ได้ผลตอบแทนสูงขึ้น และอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่จะดึงดูดให้ผู้เลี้ยงไหม และทำธุรกิจด้านไหมมากขึ้น นำมาซึ่งการอนุรักษ์ไหมพันธุ์ไทยแท้และสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีการสะสมของลูทีน (lutein) ในต่อมสร้างเส้นใยไหมมากถึงร้อยละ 90 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและมีคุณสมบัติเฉพาะที่พบในไหมเหลืองเท่านั้น (Tabunoki et al., 2002) นอกจากนั้น Tabunoki et al. (2004) ยังพบว่าในไหมเหลืองมีแคโรทีนอยด์ที่มีออกซิเจนในโมเลกุล (xanthophyll) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งรังไหมเหลืองแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณลูทีนต่างกัน โดยจากการศึกษาพบว่าปริมาณลูทีนร้อยละ 80 60 และ 60 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ในรังไหมพันธุ์ N13 (สีเหลือง) N16 (สีเหลืองทอง) และ N21 (สีเหลืองทอง) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ในเศษไหม (พันธุ์นางน้อย) จากอุตสาหกรรมสิ่งทอในประเทศไทยที่มีมากถึง 36.6 ตันต่อปี โดย Prommuak, De-Eknamkul and Shotipruk (2008) พบว่า เศษไหมมีแคโรทีนอยด์เป็นองค์ประกอบ 0.73 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งประกอบด้วยลูทีนมากถึง 0.64 มิลลิกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง)

เนื่องจากลูทีนมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงถูกนำไปใช้เป็นสารสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง รวมทั้งอุตสาหกรรมยา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าลูทีนช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรัง (chronic disease) เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง และโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ (Khachik, 1995; Madhavi and Kagan, 2002; Rodriguez, Torres-Cardona, and Diaz, 2001) ทำให้ปัจจุบันมีลูทีนออกมาจำหน่ายมากมายในรูปแบบอาหารเสริมทั้งในรูปแบบเม็ด แคปซูล และสเปรย์โดยผลิตภัณฑ์ลูทีนตามท้องตลาดส่วนมากได้มาจากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) ซึ่งถือเป็นแหล่งของลูทีนทางการค้าที่สำคัญในปัจจุบัน และทำให้มีการเจริญเติบโตทางธุรกิจในหลาย ๆ ประเทศ มีการรายงานว่ารังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย (*Bombyx mori* L.) เป็นแหล่งใหม่ลูทีน (WO 2012/091683 A1) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าลูทีนจากรังไหมเหลืองมีความสามารถในการ

วิธีวัดหลักเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ (Kaewkumsan, 2009) เพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) จากรังสีอัลตราไวโอเลต (Pongcharoen, Warnnissorn, Lertkajornsinn, Limpeanchob, and Sutheerawattananonda, 2013) อีกทั้งยังสามารถเพิ่มการสร้างไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์ลูคิน-2 (interleukin-2, IL-2) และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (interferon-gamma; IFN- γ) ในระบบภูมิคุ้มกันได้ ในขณะที่สารสกัดจากดอกดาวเรืองไม่พบว่ามีฤทธิ์ส่งเสริมการสร้างไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์ลูคิน-2 และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (Promphet, Bunarsa, Sutheerawattananonda, and Kunthalert, 2014) จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของลูทีนจากดอกดาวเรืองและลูทีนจากรังไหมเหลืองมีความแตกต่างกัน แสดงว่าลูทีนจากรังไหมเหลืองมีองค์ประกอบอื่นที่เกี่ยวข้องต่อประสิทธิภาพดังกล่าว อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีรายถึงองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของลูทีนจากรังไหมเหลืองเทียบกับลูทีนจากดอกดาวเรือง อีกทั้งงานวิจัยที่ผ่านมาการศึกษาโดยใช้รังไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อยเพียงสายพันธุ์เดียว ดังนั้นรังไหมเหลืองพันธุ์ไทยพื้นบ้านสายพันธุ์อื่นจึงถือเป็นอีกหลายตัวเลือกที่จะช่วยเพิ่มแหล่งของลูทีนที่สามารถหาได้ในประเทศ อีกทั้งยังช่วยลดการนำเข้าลูทีนจากต่างประเทศเพิ่มมูลค่าให้กับรังไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านและลดปริมาณของเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอได้ แม้จะมีประโยชน์มากแต่มีรายงานว่าแสงสว่างและความร้อนส่งผลต่อความคงตัวของลูทีนจากรังไหมเหลืองในระหว่างการเก็บรักษา (Kaewkumsan, 2009) และมีการศึกษาที่พบว่า โทรลิกซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีสามารถป้องกันการเสื่อมสลายของลูทีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Aimjongjun, Sutheerawattananonda, and Limpeanchob, 2013) การศึกษาปริมาณวิตามินอีที่เหมาะสมก็จะช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนในระหว่างการเก็บรักษาได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาปริมาณลูทีนในรังไหมเหลืองพันธุ์พื้นบ้านของไทยชนิดต่าง ๆ ศึกษาความคงตัว ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบสำคัญที่อยู่ในสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อหาปริมาณของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์พื้นบ้าน 5 สายพันธุ์
- 1.2.2 เพื่อศึกษาแบบจำลองทางจลนศาสตร์ (kinetic model) ของการสลายตัวของลูทีน
- 1.2.3 เพื่อแยกและพิสูจน์องค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC)
- 1.2.4 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือง

1.3 สมมติฐาน

1.3.1 สารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์พื้นบ้าน 5 สายพันธุ์ มีปริมาณแตกต่างกันโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อสีของรังไหมเข้มขึ้น

1.3.2 ความคงตัวของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองที่เก็บรักษาในสภาวะต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และระยะเวลาการได้รับแสง

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1.4.1 รังไหมที่ใช้ในการทดลองทั้ง 5 พันธุ์ คือ นางน้อย นางสาว นางคู่ย นางลาย และลำโรง ได้จากการเลี้ยงโดยศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ

1.4.2 ลูทีนทางการค้าที่ใช้ในการทดลอง เป็นลูทีนที่สกัดจากดอกดาวเรือง และมีความบริสุทธิ์ 95% (95% แชนโทฟิลล์)

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 การเตรียมสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์พื้นบ้าน 5 สายพันธุ์ คือ พันธุ์นางน้อย พันธุ์นางคู่ย พันธุ์นางลาย พันธุ์นางสาว และพันธุ์ลำโรง

1.5.2 การสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และหาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography)

1.5.3 การแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

1.5.4 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองที่เก็บไว้ในสภาวะต่าง ๆ

1.5.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS radical-scavenging activity, DPPH radical-scavenging, Scavenging activity of hydroxyl radical (OH•) และ Metal-chelating assay

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้แหล่งของลูทีนที่ใช้วัตถุดิบพื้นบ้าน เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับไหมพันธุ์ไทย และช่วยลดหรือทดแทนการนำเข้าลูทีนจากต่างประเทศ

1.6.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาลูทีนและการทำนายอายุการเก็บรักษาที่ถูกต้อง

บทที่ 2

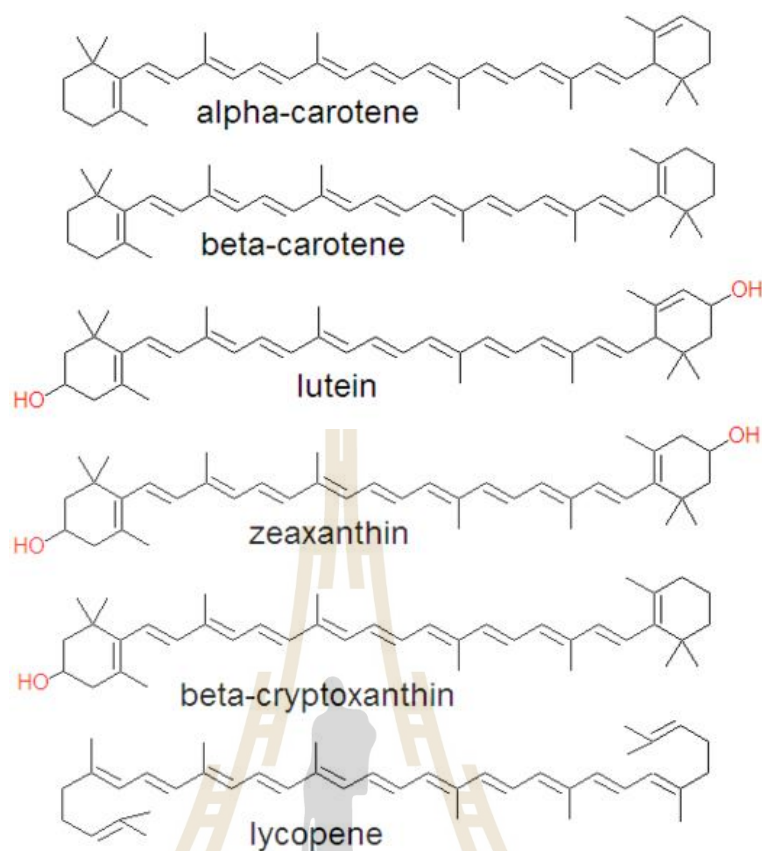
ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลูทีน

2.1.1 โครงสร้างทางเคมี

สารแคโรทีนอยด์ในธรรมชาติ สามารถแบ่งตามลักษณะของโครงสร้างได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ ไฮดรอกซีแคโรทีนอยด์ (hydroxy carotenoids) หรือแซนโทฟิลล์ เป็นแคโรทีนอยด์ที่มีหมู่แทนที่เป็นออกซิเจนหรือหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างไฮโดรคาร์บอนหลัก และกลุ่มที่สอง คือ ไฮโดรคาร์บอนแคโรทีนอยด์ (hydrocarbon carotenoids) หรือแคโรทีน (carotenes) ที่มีเฉพาะคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง เช่น แอลฟาแคโรทีน (α -carotene) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) และไลโคพีน (lycopene) เป็นต้น

ลูทีนหรือ (3R, 3'R, 6'R)- β , ϵ -carotene-3, 3'-diol มีลักษณะปรากฏเป็นสีเหลืองหรือสีส้ม ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น จัดเป็นแคโรทีนอยด์ในกลุ่มของแซนโทฟิลล์ โดยลูทีนมีโครงสร้างเป็นคาร์บอนสายยาวที่ประกอบด้วยพันธะคู่ และพันธะเดี่ยวสลับกัน ที่ปลายสายคาร์บอน (carbon backbone) ทั้งสองข้างเชื่อมกับวงแหวนที่เชื่อมกับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) (ดังภาพที่ 2.1) หมู่ไฮดรอกซิลที่ปลายของโมเลกุลทั้งสองข้างทำให้ลูทีนและซีแซนทีน (zeaxanthin) มีคุณสมบัติแตกต่างจากแคโรทีนอยด์ตัวอื่น (Khoo, Prasad, Kong, Jiang, and Ismail., 2011) ซึ่งจากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาพบว่า สารในกลุ่มนี้มีความพิเศษและมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างจากแคโรทีน เช่น มีความเป็นขั้วมากกว่าแอลฟาแคโรทีน เบต้าแคโรทีน และไลโคพีน นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่ยังเชื่อว่าโครงสร้างเฉพาะตัวนี้ทำให้แซนโทฟิลล์มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่เฉพาะเจาะจง (Rodriguez-Amaya, 2001) อีกด้วย



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์

ที่มา: Ribaya-Mercado and Blumberg (2004)

2.1.2 แหล่งที่พบและปริมาณลูทีน

ทางโภชนศาสตร์ถือว่า ลูทีนและซีแซนทีนเป็นสารอาหารที่จำเป็นแบบมีเงื่อนไข เนื่องจากร่างกายของมนุษย์ และสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ต้องได้รับทางอาหารเท่านั้น ซึ่งอาหารที่เป็นแหล่งของลูทีนที่สำคัญ คือ ผักและผลไม้ที่มีสีเขียวเข้มและสีเหลือง-แดง ได้แก่ ผักคะน้า ผักโขม กะหล่ำดอกเขียว ผักตระกูลกะหล่ำสีเขียวเข้มต่าง ๆ บร็อคโคลี่ ถั่วลันเตา บวบ ส้ม ข้าวโพด พริกเหลือง และพืชรวมถึงไข่แดง (Holden et al., 1999; Sommerburg, Keunen, Bird and van Kuijk, 1998) นอกจากนี้ที่กล่าวมาแล้ว ดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) ยังเป็นแหล่งของลูทีนทางการค้าที่สำคัญในปัจจุบัน และทำให้มีการเจริญเติบโตทางธุรกิจทั้งในประเทศเม็กซิโก (Mexico) เปรู (Peru) เอกวาดอร์ (Ecuador) สเปน (Spain) อินเดีย (India) และจีน (China) โดยดอกดาวเรืองแห้งมีปริมาณแคโรทีนอยด์ร้อยละ 0.1-0.2 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งประกอบด้วยลูทีนที่อยู่ในรูปเอสเทอร์มากถึงร้อยละ 80 (Sivel, Kracmar, Fisera, Klejdus, and Kuban, 2014) (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของลูทีนจากแหล่งต่าง ๆ

Source	Distribution of major carotenoids (mole%) ^a							Lutein composition ^d		References
	Lutein/ Zeaxanthine	Lutein	Cryptoxanthins	Lycopenes	α -Carotene	β -Carotene	Neoxanthins/ violaxanthins	mg/100g fresh wt.	mg/100g dry wt.	
Animal products:										
Yellow silk cocoons (<i>Bombyx mori</i>)	97	84	-	-	0	0	-	46.61	51.628	-
Egg yolk	89	54	4	0	0	0	8	3.766 ⁽¹¹⁾	0.723	-
Fruits/vegetables:										
Kale, raw	-	-	-	-	-	-	-	39.550 ⁽¹⁾	12.310	-
"Winterbor" kale	-	-	-	-	-	-	-	15.10-6.90	71-112	(1), (3), (10)
Squash, pepper peel	-	-	-	-	-	-	-	30.180	-	(2)
Squash, pepper fresh	-	-	-	-	-	-	-	0.870	-	(3)
Spinach	47	47	19	4	0	16	14	11.940 ⁽¹⁾	3.740	133.7 ⁽⁴⁾ -34.9
Leaf lettuce	15	15	36	0	16	0	33	2.635	-	(1), (3-6)
Broccoli	22	22	49	0	0	27	3	2.445 ⁽¹⁾	1.553	(1)
Summer squash	52	47	24	0	0	5	19	2.125	-	(1), (10)
Brussel sprouts	29	27	39	0	0	11	20	1.590	-	(1)
Peas (green)	41	41	21	0	0	5	33	1.350	-	(1)
Corn	86	60	5	0	0	0	9	0.884 ⁽¹⁾	0.199	2.07 ⁽⁸⁾
Green beans	0	0	28	0	0	0	72	0.640 ⁽¹⁾	0.453	(1), (5-6)
Potato, fresh	-	-	-	-	-	-	-	0.410-0.250	-	(1), (10)
Carrots, baby	-	-	-	-	-	-	-	0.358	-	(3)
Carrot	2	2	0	0	43	55	0	0.298	-	(1)
Cabbage	-	-	-	-	-	-	-	0.310	-	(5)
Oranges	22	7	12	11	8	11	36	0.187	-	(1)
Papaya	-	-	-	-	-	-	-	0.075 ⁽¹⁾	0.044	-
Peaches	13	5	8	0	10	50	20	0.04	-	(1), (10)
Winter squash	-	-	-	-	-	-	-	0.038	-	(10)
Mango	18	2	4	6	0	20	52	0.020	-	(1)
Grapefruit, red	-	-	-	-	-	-	-	0.013	-	(1)
Tomatoes	6	6	0	82	0	12	0	0.130 ⁽¹⁾	0.050	(1), (5)
Flowers:										
Marigold petals ^b	-	-	-	-	-	-	-	161-611	-	(7)
Marigold petals ^c	-	-	-	-	-	-	-	16.77-569.90	-	(8)
Marigold calyces ^c	-	-	-	-	-	-	-	0.38-18.60	-	(8)

หมายเหตุ: ^aข้อมูลจาก Sommrubuth et al. (1998); ^bLutein diesters ในดอกดาวเรืองจากจีน (*T. erecta*); ^c Lutein และ lutein esters จากดอกดาวเรือง *Tagetes patula* และ *T. erecta*; ^dข้อมูลการศึกษาจาก (1) U.S. Department of Agriculture (1998); cite in Alves-Rodrigues and Shao (2004); (2) Lefsrud et al. (2007); (3) Tsao and Yang (2006); (4) Liu, Perera and Suresh (2007); (5) Konings and Roomans (1997); (6) Aman et al. (2005); (7) Li et al. (2007); (8) Piccagli, Marotti, and Grandi (1998); (9) Handelman et al. (1999); (10) Humphries and Khachik (2003); (11) Schatterer and Breithaupt (2006)

ที่มา: Kaewkumsan (2009)

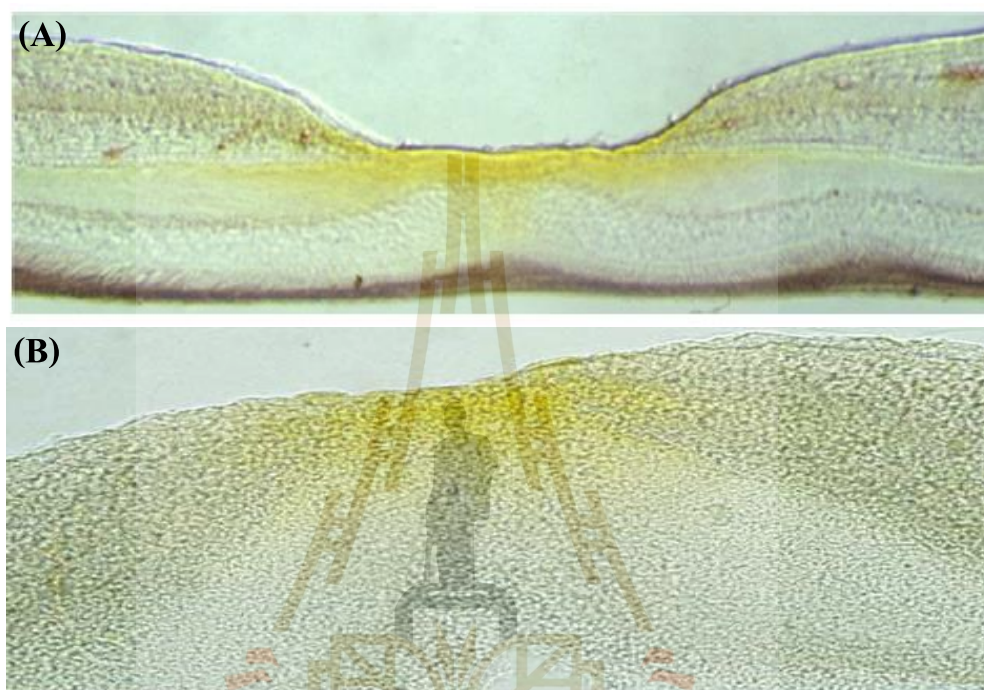
ในพืชสีเขียวลูทีนทำหน้าที่กรองแสงสีน้ำเงินที่มีพลังงานสูงและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากแสง (photooxidation) ของคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และโครงสร้างอื่น ๆ ที่มีความไวต่อแสงและการเสื่อมสลาย (degradation) นอกจากนี้ในผักและผลไม้สีเหลือง-ส้ม ได้แก่ แอปริคอต แครอท แคนตาลูป และมะเขือเทศ พบว่ามีลูทีนเป็นส่วนประกอบมากเช่นกัน แต่มีในปริมาณที่น้อยกว่าเบต้าแคโรทีน (Furr and Clark, 1997) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในแมลงบางชนิดมีการสะสมแคโรทีนอยด์และลูทีนในร่างกาย รวมถึงส่วนประกอบอื่น ๆ ที่สร้างขึ้น โดยแมลงแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการสะสมสารแคโรทีนอยด์ต่างชนิดกัน เช่น แมลงในกลุ่มของออร์โทพเทอร่า (Orthoptera) และฟาสมิดา (Phasmida) จะเลือกสะสมแคโรทีน แมลงในกลุ่มเลปิโดพเทอร่า (Lepidoptera) เช่น ไหมเหลืองจะสะสมสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ (Jouni and Wells, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการสกัดแคโรทีนอยด์จากบริเวณต่อมพ่นใยไหม (silk glands) ของหนอนไหมโดย Tabunoki et al. (2002) พบว่า แคโรทีนอยด์ในหนอนไหมจะจับกับโปรตีน (carotenoid binding protein; CBP) ที่มีขนาดโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน (kDa) ในอัตราส่วน 1 : 1 โมลาร์ ซึ่งแคโรทีนอยด์ดังกล่าวประกอบด้วยลูทีนมากถึงร้อยละ 90 ส่วนที่เหลือจะประกอบด้วยเบต้าและแอลฟาแคโรทีน เมื่อแคโรทีนอยด์ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในสภาพที่เปลี่ยนแปลงถาวรหรือแบบไม่ถาวร ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงแบบถาวร เช่น การเกิดปฏิกิริยาของคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุลหลักกับหน่วยย่อย หรือการเพิ่มหมู่ที่เพิ่มคุณสมบัติเชิงหน้าที่ใหม่ เช่น การเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ส่วนการเปลี่ยนแปลงแบบไม่ถาวรจะเป็นการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของไฮดรอกซีแคโรทีนอยด์กับกรดไขมันโมเลกุลใหญ่ที่พบในร่างกาย (Harashima, Ohno, Sawachika, Hidaka, and Ohnishi, 1972; Kayser, 1975) หรืออาจรวมตัวกับโปรตีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เรียกว่า แคโรทีโนโปรตีน (carotenoproteins) ซึ่งละลายได้ดีในน้ำ และมีความคงตัวมากกว่าแคโรทีนอยด์ (Terra, Ferreira, De Bianchi, and Zinner, 1981)

2.2 ความสำคัญของลูทีน

2.2.1 คุณสมบัติการป้องกันโรคตา

ลูทีนและสเตอรอล ไอโอโซเมอร์ของลูทีน คือ ซีแซนทีนเป็นแคโรทีนอยด์เพียงสองชนิดเท่านั้นที่พบมากในเลนส์ตาและเรตินา (retina) บริเวณจุดศูนย์กลางภาพซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการมองเห็นภายในดวงตาของมนุษย์และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Aman, Bayha, Carle, and Schieber, 2004) ตำแหน่งจุดรับภาพของลูกตา (macula) ถือเป็นตำแหน่งสำคัญที่สุดในจอประสาทตา (Landrum and Bone, 2001; Sommerburg et al., 1998; Yemelyanov, Katz, and Bernstein, 2001) เพราะเป็นจุดที่รูปภาพ แสงส่วนมากมาตกกระทบและเป็นส่วนที่จอตารับภาพได้ชัดที่สุด บริเวณจอประสาทตา

เป็นเนื้อเยื่อชั้นในสุดของลูกตา และประกอบด้วยส่วนของศูนย์กลางของการมองเห็นที่เรียกว่า มาคูลาลูเทีย (macula lutea) ซึ่งมีสีเหลืองตามสีของลูทีนและซีแซนทีนที่สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อบริเวณนี้ ด้วยความเข้มข้นสูงเรียกว่า สารสี (macular pigments) (ภาพที่ 2.2) (Kijlstra, Tian, Kelly, and Berendschot, 2012)



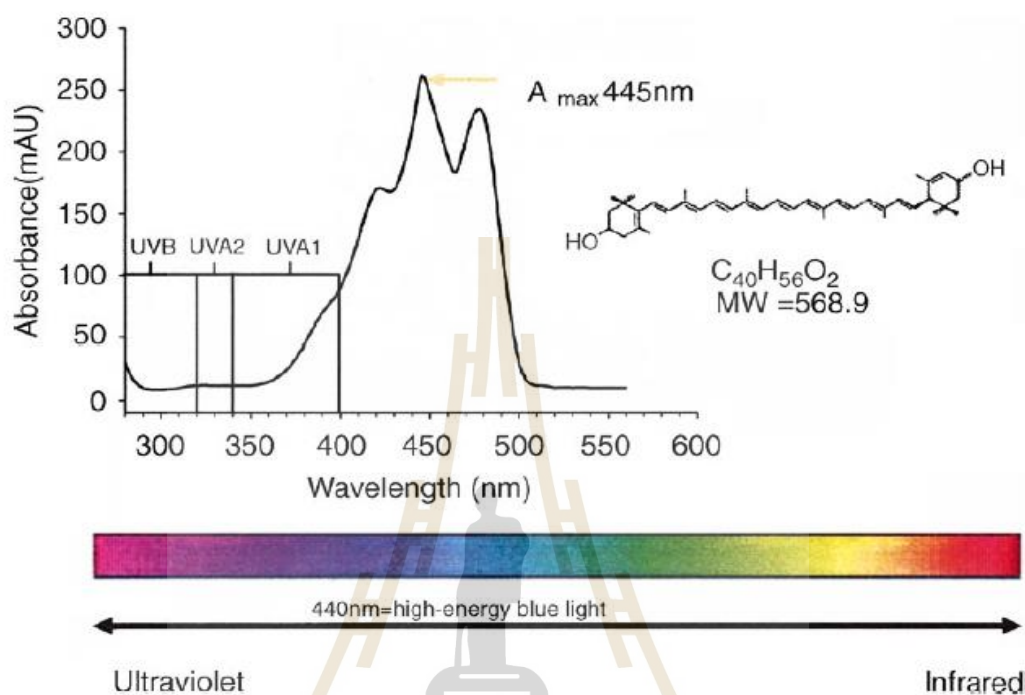
ภาพที่ 2.2 ภาพจากเนื้อเยื่อบริเวณโพเวียของลิง (A) และมนุษย์ (B) ที่แสดงถึงการกระจายตัวของ สารกลุ่มแซนโทฟิลล์บริเวณจุดกลางรับภาพของจอประสาทตา

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kijlstra, Tian, Kelly, and Berendschot (2012) และ Trieschmann et al. (2008)

2.2.1.1 คุณสมบัติการกรองแสงสีน้ำเงิน (blue light)

จอประสาทตาถูกทำลายได้ด้วยแสง แต่ส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับช่วงความยาวคลื่น เวลาที่สัมผัสกับแสง และระดับพลังงานของแสง (Ham, Mueller, and Sliney, 1976) ลูทีนดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร (ภาพที่ 2.3) ทำให้สามารถกรองแสงสีน้ำเงินซึ่งเป็นแสงที่มีพลังงานสูงสุดในกลุ่มแสงที่ตาของมนุษย์สามารถมองเห็นได้ (visible light) โดยแสงสีน้ำเงินสามารถทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของดวงตาได้ (photo-oxidation damage) (Bone et al., 1997) โดยการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจน หรือ reactive oxygen species (ROS) ดังนั้นลูทีนและซีแซนทีนในมาคูลาลูเทีย จึงมีบทบาทในการป้องกันอันตรายจากแสง (photoprotective agent) โดยการกรองแสงสีน้ำเงินจากแสงดวงอาทิตย์ สอดคล้องกับการศึกษาในลิงวอก (rhesus monkeys) ที่ได้รับลูทีน

เป็นอาหารเสริม แล้วพบว่าลูทีนสามารถป้องกันการทำลายศูนย์กลางการมองเห็นจากแสงสีน้ำเงินได้ (Barker et al., 2011b)



ภาพที่ 2.3 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของลูทีน

ที่มา: Alves-Rodrigues and Shao (2004)

2.2.1.2 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในจอประสาทตา

จอประสาทตามีความต้องการออกซิเจนสูง และเมแทบอลิซึมของเซลล์แบบใช้ออกซิเจน (aerobic metabolism) ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง (reactive oxygen intermediates) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (singlet Oxygen) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) (Carpentier, Knaus, and Suh, 2009) โดยอนุมูลอิสระที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้ทำให้เกิดความเสียหายต่อลิพิด (lipid) ในจอประสาทตา ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เช่น กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (docosahexaenoic acid; DHA) อนุมูลอิสระออกซิเจนที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์รับแสงในดวงตา (photoreceptor) ในขณะที่ลูทีนสามารถขัดขวางการตายของเซลล์จอประสาทตาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (Chucair et al., 2007) โดยลูทีนจะคอยทำหน้าที่ดักจับ (scavenge) สาร

ที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง (oxygen intermediates) (Woodall, Lee, Weesie, Jackson, and Britton, 1997) นอกจากนี้ลูทีนยังช่วยลดการสะสมของไลโปฟัสซิน (lipofuscin) ในเซลล์เม็ดสีที่เยื่อบุเรตินา (retinal pigment epithelial cells) ที่เพาะเลี้ยงได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลูทีนสามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชัน (peroxidation) ของเยื่อหุ้มเซลล์และฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ในส่วนนอก (outer segment) ของเซลล์รับแสง (Sundelin and Nilsson, 2001)

2.2.1.3 ลดความเสี่ยงและชะลอโรคจอประสาทตาเสื่อม

โรคจอประสาทตาเสื่อม (age-related macular degeneration; AMD) เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมสภาพของศูนย์กลางการมองเห็นที่จอประสาทตา ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะตาบอดในกลุ่มคนอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป (Newcomb, Klein, and Massoth, 1992) โรคจอประสาทตาเสื่อมแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. แบบแห้ง (Dry AMD) เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด จะมีการเสื่อมสลายและบางลงของจุดกลางรับภาพจอประสาทตา (macula) จากขบวนการเสื่อมตามอายุ (aging) ความสามารถในการมองเห็นจะค่อย ๆ ลดลง และเป็นไปอย่างช้า ๆ (ศูนย์จักษุรักษาสวนจิตรลดา, 2547)

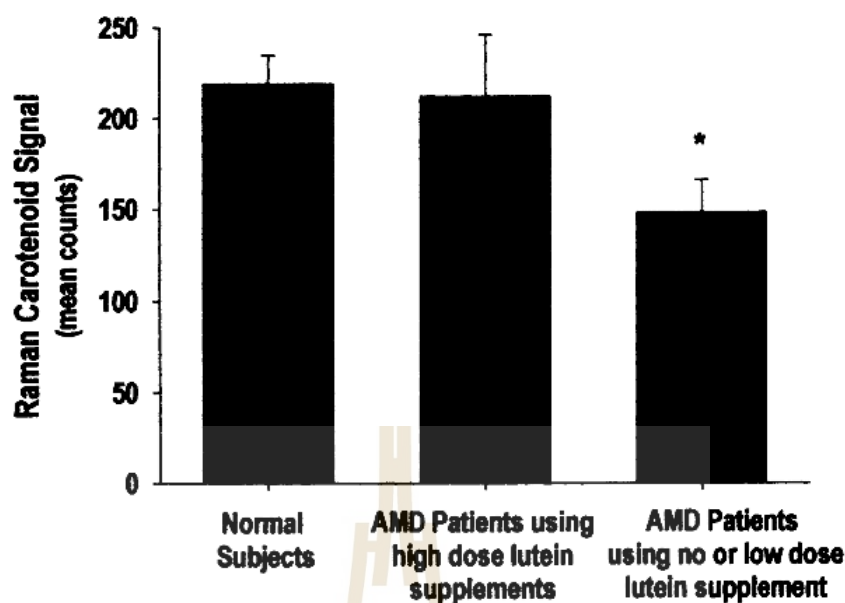
2. แบบเปียก (Wet AMD) พบประมาณ 10-15% ของโรคจอประสาทตาเสื่อมทั้งหมด แต่มีลักษณะการเกิดการสูญเสียการมองเห็นอย่างรวดเร็ว และเป็นสาเหตุสำคัญของการตาบอดในโรค จอประสาทตาเสื่อม เกิดจากการที่มีเส้นเลือดผิดปกติงอกอยู่ใต้จอประสาทตา และผนังชั้นพีเลีย (Retinal pigment epithelium) มีการรั่วซึมของเลือดและสารเหลวจากเส้นเลือดเหล่านี้ ทำให้จุดกลางรับภาพวม ผู้ป่วยจะเริ่มมองเห็นภาพตรงกลางบิดเบี้ยว และมีจุดดำในที่สุด เมื่อเซลล์ประสาทตาย (ศูนย์จักษุรักษาสวนจิตรลดา, 2547)

แซนโทฟิลล์บริเวณมาคูลาลูทีนสามารถเสื่อมสลายหรือลดลงตามอายุของมนุษย์ และสัตว์ที่เพิ่มขึ้น บางกรณีมีการเสื่อมสลายแบบผิดปกติในกลุ่มผู้ป่วยโรคตาหรือผู้ที่มิภาวะขาดลูทีนซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคตาเสื่อม ถ้าไม่ได้รับการบำบัดโรคหรือปรับภาวะทางโภชนาการที่เหมาะสมจะทำให้ตาบอดในที่สุด จากรายงานของ Resnikoff, Pascolini, Mariotti, and Pokharel (2008) พบว่า ผลการสำรวจประชากรทั่วโลกในปี 2002 พบผู้ป่วยและผู้มีอาการสัมพันธ์กับโรคตาเสื่อมมากกว่า 161 ล้านคน และประมาณ 37 ล้านคนตาบอด โดยร้อยละ 57 เกิดจากโรคตาเสื่อมในผู้สูงอายุ หรือ AMD และโรคต้อเนื้อและต้อกระจก (cataracts) ส่วนใหญ่มักพบในประชากรที่มีอายุเฉลี่ยมากกว่า 50 ปี ขึ้นไป และเพศหญิงจะมีแนวโน้มความเสี่ยงมากกว่าในเพศชาย นอกจากนี้ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (Postmenopausal) ยังมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคตาเสื่อมเพิ่มขึ้นถึง 400-500% (Chasan-Taber et al., 1999; Mares-Perlman, Millen, Ficek, and Hankinson, 2002) ประชากรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแปซิฟิกใต้เป็นพื้นที่ที่พบผู้ป่วยด้วยโรคตาเสื่อมมากที่สุด และมากกว่าประชากรในแถบแอฟริกา อเมริกา เมอร์ดิเตอร์เรเนียนตะวันออก และยุโรป ถึงประมาณ

2-3 เท่า ซึ่งประเทศในแถบนี้มีแนวโน้มอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยสูงกว่า ตัวอย่างเช่นในอเมริกาและยุโรป ที่พบการเกิดโรคในผู้ใหญ่ที่มีอายุเฉลี่ยมากกว่า 65 ปีขึ้นไป (Seddon, Ajani, and Sperduto, 1994)

นอกจากสาเหตุการเสื่อมสลายของลูทีนและซีแซนทีนจากการป้องกันเนื้อเยื่อตาที่เกิดจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น แสงแดด รังสี สารเคมี และมลพิษต่าง ๆ แล้ว ผู้สูงอายุมักมีปัญหาเรื่องการเคี้ยวและความเสื่อมของระบบย่อยอาหาร ดังนั้นการได้รับลูทีนต่อวันเพื่อชดเชยส่วนที่เสื่อมสลายไปในแต่ละวันจึงไม่เพียงพอ ประกอบกับโดยปกติแล้วการได้รับลูทีนจากอาหารในแต่ละวันของคนทั่วไปมีปริมาณค่อนข้างต่ำ และยังไม่เพียงพอต่อการป้องกัน หรือช่วยลดอาการของโรคตาเสื่อมได้ จากผลสำรวจประชากรในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า การบริโภคลูทีนและซีแซนทีนวันละประมาณอยู่ในช่วง 0.8 ถึง 4 มิลลิกรัมต่อวัน เมื่อคิดเฉพาะการบริโภคลูทีนต่อวันอยู่ที่ 2.45 มิลลิกรัมโดยเฉลี่ย (Beatty, Koh, Phil, Henson, and Boulton, 2000) มีการศึกษาปริมาณลูทีนและซีแซนทีนในจอประสาทตาของคนปกติกับผู้ป่วยโรคจอประสาทตาเสื่อมจากการได้รับการบริจาจากจากผู้ป่วยโรคดังกล่าวโดย Bone et al. (2001) พบว่า ในจอประสาทตาของคนปกติมีปริมาณของลูทีนและซีแซนทีนสูงกว่าผู้ป่วยโรคจอประสาทตาเสื่อมถึงร้อยละ 82 การศึกษานี้ถือได้ว่าเป็นการศึกษาแรกที่ตรวจสอบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นลูทีนและซีแซนทีนในจอประสาทตากับความเสี่ยงในการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมของมนุษย์ และจากการศึกษาโดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคจอประสาทตาเสื่อมที่ได้รับและไม่ได้รับอาหารเสริมลูทีน โดย Bernstein et al. (2002) พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับลูทีน (≥ 4 มิลลิกรัมต่อวัน) จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์ในจอประสาทตาสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับลูทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 2.4

แม้จะมีรายงานว่าการรับประทานลูทีนยังไม่มีผลที่แน่ชัดในการป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมและต้อกระจก (Chong, Wong, Kreis, Simpson, and Guymer, 2007; Fernandez and Afshari, 2008) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการรับประทานอาหารที่มีปริมาณลูทีนและซีแซนทีนสูงสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ (Tan et al., 2008)



ภาพที่ 2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในจอประสาทตาโดยใช้เทคนิครามานสเปกโตรสโกปี (Raman spectroscopy) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคจอประสาทตาที่ได้รับลูทีนในระดับความเข้มข้นสูง (≥ 4 มิลลิกรัมต่อวัน) และไม่ได้รับลูทีนเป็นอาหารเสริม หรือได้รับในระดับความเข้มข้นต่ำ (275 ไมโครกรัมต่อวัน)

ที่มา: Alves-Rodrigues and Shao (2004)

2.2.1.4 ลดความเสี่ยงและชะลอโรคต้อกระจก

โรคต้อกระจกเกิดจากการตกตะกอนของโปรตีนภายในเลนส์แก้วตา การมองเห็นของผู้ป่วยโรคนี้จะไม่ชัดเจนและพล่ามัว หากไม่มีการรักษาจะทำให้ผู้ป่วยสูญเสียการมองเห็นหรือตาบอดได้ (Bron, Vrensen, Koretz, Maraini, and Harding, 2000) การรักษาโรคต้อกระจกทำได้โดยการผ่าตัดเอาส่วนที่ขุ่นมัวออก (Steinberg et al., 1993) แม้จะยังไม่มีขอมรับจากองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration; FDA) ถึงผลของลูทีนต่อการป้องกันโรคต้อกระจก (Trumbo and Ellwood, 2006) แต่มีการรายงานทางระบาดวิทยา (epidemiological) ว่าการบริโภคลูทีนหรือมีระดับของลูทีนในเลือดสูงสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต้อกระจกได้ (Jacques, 1999; Moeller, Jacques, and Blumberg, 2000) (ตารางที่ 2.2) ซึ่งความสามารถดังกล่าวอาจเกิดจากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการกรองแสงสีน้ำเงินของลูทีน (Chitchumroonchokchai, Bomser, Glamm, and Failla, 2004)

ตารางที่ 2.2 การศึกษาผลของปริมาณลูทีนต่อการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต้อกระจก

Study	Parameter assessed	Endpoint assessed	Comparison	Outcome
Gale et al. (2001)	Serum carotenoids	Prevalence of posterior subcapsular cataract	> 0.20 mol/l vs. < 0.14 mol/l lutein	↓ Risk 50%
Chasan-Taber et al. (1999)	Carotenoid intake	Incidence of cataract extraction	13.7 mg per day per lutein vs. 1.1 mg per day per lutein	↓ Risk 22%
Brown et al. (1999)	Carotenoid intake	Incidence of cataract extraction	7.0 mg per day lutein vs. 1.3 mg per day lutein	↓ Risk 19%
Lyle et al. (1999a)	Antioxidant intake	Incidence of nuclear cataract	1.3 mg per day lutein vs. 0.3 mg per day lutein	↓ Risk 50%
Lyle et al. (1999b)	Serum carotenoids	Incidence of nuclear cataract	0.4 μ mol/l vs. 0.18 μ mol/l	↓ Risk 30% ^a
Hankinson et al. (1992)	Spinach intake	Incidence of cataract extraction	Consumption $\geq$ 5 times per week vs. $\leq$ time per month	↓ Risk 39%

หมายเหตุ: ^a คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ที่มา: Alves-Rodrigues and Shao (2004)

2.2.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response)

จากการทดลองในหนูโดย Chew และ Park ในปี ค.ศ. 2004 พบว่า ลูกหนูสามารถเพิ่มแอนติบอดี (antibody) ด้วยการตอบสนองต่อการสร้างโดยผ่านการกระตุ้นของเซลล์ที่ T-dependent antigens) แต่ไม่ตอบสนองต่อการสร้างโดยไม่ผ่านการกระตุ้นของเซลล์ที่ (T-independent antigens) (Jyonouchi, Zhang, Gross, and Tomita, 1994) และลูกหนูในอาหารยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบอาศัยเซลล์ (cellular immunity) และอาศัยแอนติบอดี (humoral immunity) ในแมว สุนัข และนกชิบราฟีนซ์ (zebra finches) (Kim et al., 2000a, 2000b; McGraw and Ardia, 2003)

จากการศึกษาโดย Bedecarrats and Leeson (2006) พบว่าอาหารเสริมลูกหนูไม่ส่งผลต่อภาวะภูมิแพ้ทางผิวหนัง (Cutaneous hypersensitivity) ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินิน (phyto-hemagglutinin) ในไก่ระยะไข่ (laying hen) แต่ไม่กระตุ้นแอนติบอดีชนิดทุติยภูมิ (Second antibody) ที่ตอบสนองต่อวัคซีนเชื้อไวรัสอินเฟล็กซัสบรอนไคดิสที่ระดับความเข้มข้น 125 ส่วนในล้านส่วน มีการศึกษาผลของลูกหนูจากดอกดาวเรืองต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซท์ (lymphocyte) ในหนูสายพันธุ์ BALB/c โดย Promphet, Bunarsa, Sutheerawattananonda, Kongbangkerd, and Kunthalert (2013) พบว่า ลูกหนูจากดอกดาวเรืองช่วยเพิ่มประชากรของ cytotoxic T lymphocytes ในหนูสายพันธุ์ BALB/c ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของลูกหนูจากรังไหมเหลืองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (pre-immunization) ในสัตว์ทดลองพบว่า ลูกหนูจากรังไหมเหลืองสามารถเพิ่มการสร้างไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์ลิวคิน-2 (interleukin-2, IL-2) และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (interferon-gamma; IFN- γ) ได้ (Promphet et al., 2014) แต่การศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีรายงานถึงผลของลูกหนูต่อระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์รวมถึงกลไกในการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน

2.2.3 การลดการอักเสบ (inflammation)

เนื่องจากลูกหนูมีความสามารถในการกรองแสงสีน้ำเงิน และมีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระจึงมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบ (anti-inflammatory effect) โดยลดการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ ลด proinflammatory pathways ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นนิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปปา บี (Nuclear factor kappa B; NF-kB) ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Kim et al., 2008) สอดคล้องกับการศึกษาโดย Lee et al. (2004) ที่พบว่าลูกหนูช่วยลดอนุมูลอิสระในผิวหนังที่อยู่ภายใต้แสงยูวีของหนูที่ได้รับลูกหนูเพื่อเพิ่มปริมาณลูกหนูในผิวหนังได้

Jin et al. (2006) ศึกษาความเป็นไปได้ของอาหารเสริมลูกหนูต่อการลดการอักเสบของโรคม่านตาอักเสบ (uveitis; EIU) ที่เกิดจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides; LPS) ในการทดลองแบบเฉียบพลัน (acute experimental model) โดยหนูได้รับลูกหนูทางเส้นเลือดดำ (intravenous injection) ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ตามด้วยการฉีด LPS เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ซึ่งหลังจากได้รับ LPS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หนูจะมีอาการม่านตา

อักเสบอย่างรุนแรง จากการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับลูทีนที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวแทบจะยับยั้งเซลล์อักเสบในน้ำเลี้ยงลูกตา (aqueous humor) ได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับ หนูที่ได้รับยาสเตียรอยด์ที่ลดอาการอักเสบ (dexamethasone) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ลูทีนช่วยลดการเพิ่มปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงลูกตาในช่วงที่ตาเริ่มเกิดอาการอักเสบ อีกทั้งยังทำให้ระดับไซโตไคน์ (cytokine levels) รวมทั้งอินเตอร์ลูคิน-6 (interleukin-6, IL-6) ที่เอ็นเอฟอัลฟา (tumor necrosis factor alpha; TNF-alpha) CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2) และ CXCL2 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 2) มีปริมาณลดลงเช่นกัน

2.2.4 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง

มีงานวิจัยที่ศึกษาประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งไว้อย่างหลากหลายโดย Hung et al. (2006) พบว่า แคโรทีนอยด์อาจช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งของกระเพาะปัสสาวะได้ เช่นเดียวกับ Chang et al. (2005) ที่พบว่าการได้รับแคโรทีนอยด์อาจช่วยลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผู้ที่รอดชีวิตจากการป่วยด้วยมะเร็งเต้านมอาจมีความเกี่ยวข้องกับการมีระดับแคโรทีนอยด์มากในร่างกาย ซึ่งแคโรทีนอยด์จะช่วยลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (Thomson et al., 2007) และการศึกษาในสตรีวัยก่อนหมดประจำเดือนและวัยหลังหมดประจำเดือน พบว่าในวัยก่อนหมดประจำเดือนการบริโภคผักและผลไม้ที่อุดมด้วยสารแคโรทีนอยด์ ได้แก่ วิตามินเอ เบต้าแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน และลูทีนหรือซีแซนทีนช่วยลดการเกิดโรคมะเร็งเต้านมได้ แต่ไม่พบประโยชน์ที่ชัดเจนในสตรีวัยหมดประจำเดือนแล้ว (Mignone et al., 2009) สอดคล้องกับการศึกษาโดย Tamimi, Colditz, and Hankinson (2009) พบว่าการมีระดับลูทีนและซีแซนทีนสูงในกระแสเลือดจะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งเต้านมได้มากถึงร้อยละ 40-50 โดยเฉพาะในรายที่ตรวจด้วยการถ่ายภาพเอ็กซเรย์เต้านม (mammogram) อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้ยังขัดแย้งกับการวิจัยในสตรีกลุ่มผิวขาวและผิวสีในสหรัฐอเมริกาที่พบว่า แคโรทีนอยด์อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม (Wang et al., 2009) มีการวิจัยที่พบว่าแคโรทีนอยด์อาจช่วยลดการเกิดมะเร็งที่เยื่อบุมดลูก (endometrial cancer) ได้ เนื่องจากสตรีที่เป็นมะเร็งชนิดนี้มีปริมาณของเบต้าแคโรทีน ไลโปน ซีแซนทีน ลูทีน เรตินอล และวิตามินอี (gamma-tocopherol) ในเลือดต่ำกว่าสตรีปกติ (Jeong et al., 2009; Pelucchi et al., 2008) รวมถึงการป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูก อาจเกี่ยวข้องกับการมีระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งลูทีนและซีแซนทีนในกระแสเลือดสูงเช่นเดียวกัน (Cho et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าการได้รับเบต้าแคโรทีน และแซนโทฟิลล์ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งของเนื้อเยื่อไต (renal cell carcinoma) ได้ ซึ่งผลการป้องกันนี้จะเห็นได้ชัดเจนมากในกลุ่มสตรี และคนที่มึนน้ำหนักร่างกายเกินหรืออ้วน (Hu, La Vecchia, Negri, DesMeules, and Mery, 2009)

มีหลักฐานจากงานวิจัยเกี่ยวกับประโยชน์ของลูทีนและซีแซนทีนที่พบว่า มีการสะสมอยู่ที่ผิวหนังของคน และประโยชน์ของสารเหล่านี้ในการป้องกันเซลล์ผิวหนังจากการถูกทำลายด้วยแสงรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือรังสียูวี (ultraviolet) (Santocono, Zurria, Berrettini, Fedeli, and Falcioni, 2006; Roberts, Green, and Lewis, 2009) การศึกษาในหนูที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของลูทีนและซีแซนทีนโดย Astner และคณะ ในปี 2007 พบว่าช่วยลดการเกิดความชราที่เกิดจากแสงแดด (photoaging) และการเกิดมะเร็งผิวหนังจากแสงแดด (photocarcinogenesis) จากการได้รับรังสียูวีบีได้ สอดคล้องกับการทดลองทางคลินิกในมนุษย์ที่พบว่า ลูทีนและซีแซนทีนช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของผิวหนังได้ทั้งโดยการรับประทานและทาที่ผิวหนัง แต่การรับประทานอาจให้ผลที่ดีกว่า (Palombo et al., 2007) มีการวิจัยที่พบว่าฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของลูทีนและซีแซนทีนอาจเกี่ยวข้องกับหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ชนิดนี้ (Sun and Yao, 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถในการป้องกันเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) จากรังสีอัลตราไวโอเล็ตของลูทีนจากรังไหมเหลืองโดย Pongcharoen et al. (2013) พบว่า ลูทีนจากรังไหมเหลืองไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) สามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) และการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) อีกทั้งยังลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis

2.2.5 ลดความเสี่ยงโรคเบาหวาน

ภาวะเบาหวานขึ้นจอตา (diabetic retinopathy) เกิดจาก oxidative damage กระตุ้นการสร้าง NF- κ B มีการรายงานว่ ลูทีนสามารถขัดขวางการเกิดกลไกดังกล่าวได้ ด้วยการยับยั้งอนุมูลออกซิเจน (oxygen radical) จากการทดลองโดยใช้หนูที่เป็นโรคเบาหวาน และให้ลูทีนด้วยการป้อนทางปาก พบว่าลูทีนสามารถลดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (biochemical) และบทบาทหน้าที่ (functional) โดยไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด (blood glucose levels) ซึ่งในการทดลองนี้ ลูทีนช่วยลด ROS และกิจกรรมของ NF- κ B ได้อย่างชัดเจน (Muriach et al., 2006; Sasaki et al., 2010) สอดคล้องกับการศึกษาของ Arnal และคณะในปี 2009a ที่ได้มีการศึกษาในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานโดยใช้สเตรปโตโซโทซิน (streptozotocin, STZ) แล้วพบว่าลูทีนสามารถลดการเกิดโรคต่อกระจกในสัตว์ทดลองกลุ่มนี้ได้ และเมื่อมีการศึกษาต่อในกลุ่มสัตว์ทดลองชุดเดียวกันยังพบว่า ลูทีนช่วยลดความผิดปกติที่เกิดจากโรคเบาหวานในส่วนของเปลือกสมองใหญ่ (cerebral cortex) ของหนูได้อีกด้วย (Arnal, Miranda, Barcia, Bosch-Morell, and Romero, 2010) นอกจากนี้ Arnal et al. (2009b) และ Sasaki et al. ยังพบว่า ลูทีนช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทชั้นใน (ganglion cell layer) ของเรตินาในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน เช่นเดียวกับการทดลองในเซลล์โดยใช้เซลล์รับแสงในตาของหนูแล้วพบว่า ลูทีนช่วยลดการเกิดสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (paraquat หรือ H_2O_2) ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของเซลล์ได้ (Chucair et al., 2007) ในภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycaemia) ROS จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นสารต้าน

อนุมูลอิสระอย่างเช่น ลูทีนจึงมีบทบาทสำคัญในการลดสภาวะความเครียดออกซิเดชันในเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่าง ๆ ของผู้ป่วยโรคเบาหวาน

2.3 ความคงตัวของลูทีน

ลูทีนเป็นสารที่มีโครงสร้างแบบพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยว (conjugated double bond) จึงทำให้ง่ายต่อการถูกออกซิไดส์ (oxidize) ด้วยออกซิเจนแล้วเกิดการสลายตัว

Shi and Chen (1997) ได้ศึกษาความคงตัวของลูทีนที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก (*Chlorella protothecoides*) และสารมาตรฐานลูทีนโดยเปรียบเทียบการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 -12 °C และ 5 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังศึกษาผลของแสงสว่างต่อความคงตัวของลูทีนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (4600 lux) จากการทดลองพบว่า แสงสว่างและอุณหภูมิสูงมีผลทำให้ลูทีนสลายตัวอย่างรวดเร็ว ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถชะลอการสลายตัวของลูทีนได้ทั้งในสารละลายลูทีนมาตรฐาน และลูทีนที่สกัดจากสาหร่าย สอดคล้องกับการศึกษาของ Tang and Chen (2000) ที่แสดงให้เห็นว่า อัลฟาแคโรทีน เบต้าแคโรทีน และลูทีนในเนื้อแครอทที่ผ่านการทำแห้งแบบการแช่เยือกแข็ง (freeze drying) มีปริมาณลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาการได้รับแสง

Lavecchia and Zuorro (2006) ได้ทำการทดสอบความคงตัวของลูทีนในน้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil) และน้ำมันรำข้าว (rice bran oils) ที่ช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส โดยบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 10 วัน พบว่า ความคงตัวของลูทีนในน้ำมันพืชขึ้นกับอุณหภูมิ และชนิดของน้ำมัน

Li et al. (2009) ทำการศึกษาสารพฤกษเคมี (phytonutrients) ใน *Angelica keiskei* ซึ่งเป็นพืชพันธุ์พื้นเมืองของญี่ปุ่น ที่ประกอบด้วย ลูทีน ทรานส์-เบต้าแคโรทีน (*trans*- β -carotene) และฟีนอล (phenols) พบว่า สารพฤกษเคมีทั้งหมด มีความเสถียรที่สุดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน โดยเบต้าแคโรทีนจะเสื่อมสลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการเก็บ 2 เดือน และลูทีนจะเสื่อมสลายที่อุณหภูมิห้องเมื่อเก็บรักษานาน 12 เดือน

Lin and Chen (2005) ศึกษากรรมวิธีการรักษาความคงตัวของแคโรทีนอยด์ในน้ำมันมะเขือเทศ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของไลโคปีน ลูทีน และเบต้าแคโรทีนในน้ำมันมะเขือเทศเมื่อเก็บที่สภาวะต่าง ๆ โดยเก็บภายใต้สภาวะที่ได้รับแสง และที่บ่มแสงที่อุณหภูมิ 4 °C 25 °C และ 35 องศาเซลเซียส นาน 12 สัปดาห์ พบว่า ของลูทีนในรูปแบบทรานส์ ไลโคปีนในรูปซิส และเบต้าแคโรทีนจะเสื่อมสลายมากขึ้นเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงและในสภาวะที่ได้รับแสง

การศึกษาความคงตัวของลูทีนในน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดมัสตาร์ด (mustard seed) ที่ผ่านและไม่ผ่านการคั่วโดย Vaidya และ Choe (2011) พบว่า การเก็บรักษาน้ำมันไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 12 วันในที่มืด ทำให้ปริมาณลูทีนลดลงอย่างต่อเนื่อง และจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการเก็บรักษา ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในน้ำมันที่สกัดจากจากเมล็ดมัสตาร์ดที่ผ่าน (RMSO) และไม่ผ่านการคั่ว (URMSO) ในระหว่างการทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (oxidation) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Oxidation time (day)	URMSO	RMSO
0	96.87±4.66 ^{b1)} (100) ²⁾	100.55±9.80 ^a (100)0
3	43.87±2.89 ^d (45.3)	51.59±5.31 ^c (51.3)
6	37.37±0.41 ^f (38.6)	41.77±2.40 ^e (41.5)
9	22.74±0.67 ^g (23.5)	37.37±7.72 ^f (37.2)
12	9.32±0.06 ⁱ (9.6).	18.12±0.15 ^h (18.0)

หมายเหตุ: ¹⁾ หมายถึง ความแตกต่างทางสถิติของแต่ละตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

²⁾ หมายถึง ร้อยละการคงอยู่ (%retention) ของลูทีน

ที่มา: Vaidya and Choe (2011)

Li, Song, and Liu (2014) ศึกษาความคงตัวเชิงจลนศาสตร์ของลูทีนในผงข้าวโพดหวานจากการทำแห้งแบบการแช่เยือกแข็งในสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 4 20 และ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 สัปดาห์ โดยศึกษาผลของก๊าซออกซิเจนและแสงสว่างร่วมด้วย จากผลของการศึกษาพบว่า การเสื่อมสลายของลูทีนในรูปแบบทรานส์เป็นแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (first-order reaction) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bechoff et al. (2010) และ Chen, Peng, and Chen (1996) การประเมินจลนศาสตร์ทางความร้อน (thermal kinetic values) ของลูทีนในผงข้าวโพดหวานแสดงในตารางที่ 2.4 ค่าคงที่ของปฏิกิริยา (reaction rate constant) เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในสภาวะการเก็บที่เหมือนกัน และค่าคงที่ของปฏิกิริยาในการเก็บแบบสุญญากาศในที่มืดมีค่าน้อยกว่าการเก็บในบรรจุภัณฑ์ที่มีอากาศ ในขณะเดียวกันค่าคงที่ของปฏิกิริยาของการเก็บแบบมืดมีค่าน้อยกว่าการเก็บแบบได้รับแสง แสดงให้เห็นว่าออกซิเจนและแสงมีผลต่อการเสื่อมสลายของลูทีนในรูปแบบทรานส์ เช่นเดียวกับพลังงานก่อกัมมันต์ (activation energy) ที่พบว่าสภาวะการเก็บแบบสัมผัสกับออกซิเจนและได้รับแสงมีค่าน้อยที่สุด

ตารางที่ 2.4 การประเมินจลนพลศาสตร์ทางความร้อนของลูทีนในผงข้าวโพดหวานเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Storage	Rate constant, k (week ⁻¹)	Determination coefficient, R ²	Activation energy, E _a (kJ/mol)
vacuum and dark			
4°C	0.071	0.989	32.40±0.25
20°C	0.136	0.965	
37°C	0.318	0.928	
air and dark			
4°C	0.132	0.985	28.64±0.32
20°C	0.327	0.994	
37°C	0.494	0.987	
vacuum and light			
4°C	0.166	0.970	26.76±0.28
20°C	0.342	0.992	
37°C	0.571	0.989	
air and light			
4°C	0.519	0.942	18.88 ± 0.41
20°C	0.842	0.994	
37°C	1.241	0.987	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Li, Song, and Liu (2014)

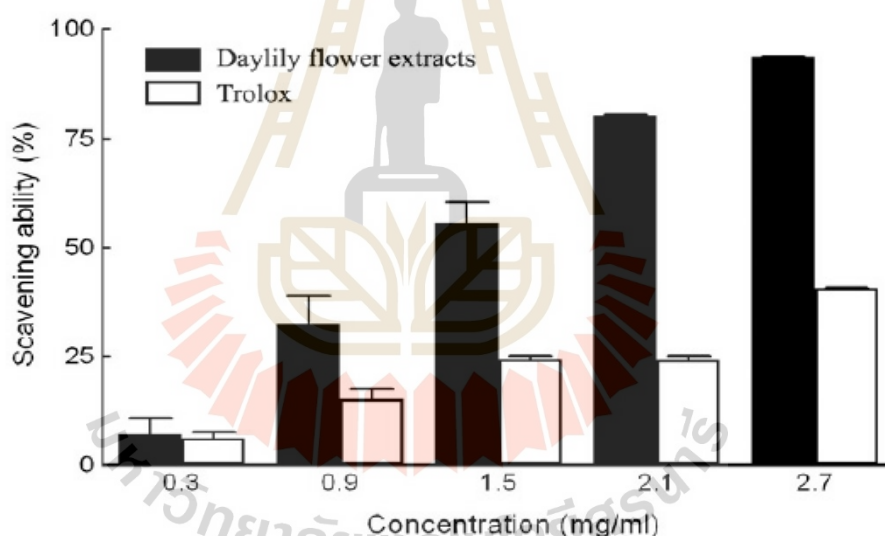
2.4 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถจับกับออกซิเจนอะตอมเดี่ยว และอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) (Stahl and Sies, 1996) ได้ แต่ความสามารถในการจับกับออกซิเจนอะตอมเดี่ยวจะขึ้นอยู่กับจำนวนของพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวในโมเลกุล และจะมีความสามารถน้อยลงเมื่อโครงสร้างส่วนปลายของโมเลกุลเป็นวง (cyclic) (Sergio, Paiva, Robert, and Russell, 1999)

การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของลูทีนจากดอกดาวเรืองโดย Wang และคณะในปี 2006 พบว่า ลูทีนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเบต้าแคโร-

ทินและไลโคปีน โดยมีค่ามากกว่าประมาณ 10 และ 15 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ในการทดสอบด้วยวิธี photochemiluminescence (PLC) assay และ β -carotene-linolenic acid model system (β -CLAMS) ยังพบว่า ลูทีนเป็นแคโรทีนอยด์เพียงชนิดเดียวในการทดลองที่สามารถยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชัน (peroxidation)

Hsu, Tsai, Chen, Ho, and Lu (2011) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของลูทีนจากดอกแคย์ลิลี่ (daylily; *Hemerocallis disticha*) ที่ได้จากการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต (supercritical carbon dioxide) โดยใช้ DPPH assay และ chemiluminescence assay เพื่อหาความสามารถในการดักจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล จากการศึกษาพบว่า ลูทีนจากดอกแคย์ลิลี่สามารถดักจับอนุมูลดิฟิพีเอชได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้น อีกทั้งยังสามารถดักจับอนุมูลอิสระดิฟิพีเอชได้ดีกว่าโทรล็อกซ์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระดิฟิพีเอชของลูทีนจากดอกแคย์ลิลี่และสารมาตรฐานโทรล็อกซ์

ที่มา: Hsu, Tsai, Chen, Ho, and Lu (2011)

นอกจากนี้ลูทีนจากดอกแคย์ลิลี่ยังสามารถดักจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิลได้ โดยมีความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (50% effective concentration; EC_{50}) น้อยกว่าสารมาตรฐานลูทีน สารมาตรฐานซีแซนทีน และสารมาตรฐานอ้างอิง ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 EC₅₀ ของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของลูทีนจากดอกแคชิลลี สารมาตรฐานลูทีน สารมาตรฐานซีแซนทีน และสารมาตรฐานอ้างอิง

	EC ₅₀		
	H ₂ O ₂ (μg/ml)	O ₂ ^{•-} (μg/ml)	•OH (μg/ml)
Daylily flower extracts	1.13±0.09 ^D	1.07±0.07 ^B	12.69±1.21 ^C
Lutein standard	6.23±1.78 ^B	7.69±0.62 ^A	98.71±3.45 ^A
Zeaxanthin standard	8.38±1.31 ^C	7.52±0.88 ^A	85.55±2.98 ^B
Reference compound ^a	12.89±0.99 ^A	8.39±0.67 ^A	84.05±2.67 ^B

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{A,B,C}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์โดยใช้วิธีของดันแคน (Duncan's multiple range test)

^a ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) ไดเมทิลซัลไฟด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) และ กลูตาไธโอน (glutathione; GSH) เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงที่ใช้ในวิธีการหาสามารถดักจับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล ตามลำดับ

ที่มา: Hsu, Tsai, Chen, Ho, and Lu (2011)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 รังไหม

รังไหมเหลือ (Bombyx mori) พันธุ์นางน้อย พันธุ์นางคู่ พันธุ์นางลาย พันธุ์นางลัว และ พันธุ์สำโรง ที่ตัดร่อนนำหนอนไหมออกแล้วเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา โดยรังไหมเหลือพันธุ์นางน้อย ซึ่งจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ อ. เมือง จ. ชัยภูมิ รังไหมเหลือพันธุ์นางคู่และนางลัว ซึ่งจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. พุทไธสง จ. บุรีรัมย์ รังไหมเหลือพันธุ์นางลาย ซึ่งจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. เมือง จ. ชัยภูมิ และ อ. เฉลิมพระเกียรติ จ. สระบุรี และ รังไหมเหลือพันธุ์สำโรง ซึ่งจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. เฉลิมพระเกียรติ จ. สระบุรี

3.1.2 การสกัดดูทิน และการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ เอทานอล (ethanol ethyl) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และเฮกเซน (hexane) (Carlo Erba, Arese, Italy) ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ใช้สารมาตรฐานแซนโทฟิลล์ (lutein, X6250, Sigma-Aldrich, Switzerland) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส ก่อนและระหว่างการใช้งาน ตามลำดับ และสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ใช้ *trans*- β -Apo-8'-carotenal (10810, Sigma-Aldrich, Switzerland) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส ก่อนและระหว่างการใช้งานตามลำดับ ใช้อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) เมทานอล (methanol) และเอทิลอะซิเตต (Carlo Erba, Rodano, Italy) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

3.1.3 ผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อความคงตัวของสารสกัดดูทิน และการแยก

องค์ประกอบของสารสกัดดูทินจากรังไหมเหลือโดยวิธี TLC

ใช้แผ่น TLC silica gel 60F 254 ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) โดยใช้โทลูอีน (toluene) (Carlo Erba, Arese, Italy) และเมทานอล (Carlo Erba, Arese, Italy) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การหาปริมาณลูทีนที่เป็นองค์ประกอบในรังไหมเหลืองจากไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ คือ นางน้อย นางสาว นางตุ้ย นางลาย และสำโรง

ทำการสกัดแยกลูทีนออกจากรังไหมเหลือง ซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ รังไหมที่ผ่านการลอกกาไหม หรือแยกโปรตีนซิริซินบางส่วนออกแล้ว และส่วนของสารละลายโปรตีนซิริซินที่ได้จากขั้นตอนการลอกกาไหม (degumming solution) โดยการนำรังไหมเหลืองขนาดกลาง (ได้จากการตัดรังไหมเป็น 8 ส่วน) มาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จากนั้นทำการสกัดโปรตีนซิริซินออกจากรังไหมโดยเติมน้ำกลั่นตัวอย่างละ 30 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำการกรองด้วยผ้ากรองขณะร้อน และทำให้เย็น จากนั้นนำส่วนของสารละลายโปรตีนซิริซิน และรังไหมที่ผ่านการลอกกาไหมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดแยกลูทีนต่อไป

3.2.1.1 การสกัดแยกลูทีนจากส่วนของรังไหมที่ผ่านการลอกกาไหมแล้ว (Patent No. WO 2012/091683 A1)

นำรังไหมเหลืองที่ผ่านการสกัดโปรตีนซิริซินออกแล้วมาสกัดแยกลูทีนออกโดยการเติมตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 3 : 2 : 1 (v/v/v) 30 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง กรองเอาส่วนของสารสกัด (organic phase) แล้วนำรังไหมมาทำการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เดิมอีก 2 ครั้ง รวบรวมสารสกัดที่ได้นำมาแยกส่วน (partition) ในกรวยแยกสีชา (amber separating funnel) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 10 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เก็บสารละลายสีเหลืองชั้นบน (upper phase) ทำการสกัดสารละลายชั้นล่างต่อด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน เอทานอล และ เอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 3 : 2 : 1 (v/v/v) และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 10 จนกว่าสารละลายชั้นล่างจะไม่มีสีเหลือง รวบรวมสารละลายสีเหลืองชั้นบนมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที ละลายสารสกัดลูทีนที่ได้ด้วยเอทานอล แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่าน syringe filter ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในและขวดแก้วเล็ก (vial) สีชา จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสารสกัดลูทีนจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานลูทีนโดยใช้ HPLC

3.2.1.2 การสกัดแยกลูทีนจากส่วนของสารละลายโปรตีนซิริซิน

ทำการสกัดลูทีนจากสารละลายโปรตีนซิริซินที่ได้จากขั้นตอนการลอกกาไหมด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Kaewkumsan (2009) และ Patent No. WO 2012/091683A1 นำสารละลายโปรตีนซิริซินใส่ลงในกรวยแยกสีชา เติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) และเอทานอลใน

อัตราส่วนต่อปริมาณโปรตีนซีรีซิน 2 : 1 และ 1 : 1 ตามลำดับ เขย่าแรง ๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นเติมตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน เอทานอล และเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 3 : 2 : 1 (v/v/v) ในอัตราส่วนต่อปริมาณโปรตีนซีรีซิน 1 : 1 เขย่าแรง ๆ ก่อนเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 10 ในอัตราส่วนต่อปริมาณโปรตีนซีรีซิน 2 : 1 ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บสารละลายสีเหลืองชั้นบน (upper phase) ทำการสกัดสารละลายชั้นล่างต่อด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน เอทานอล และ เอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 3 : 2 : 1 (v/v/v) และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 10 จนกว่าสารละลายชั้นล่างจะไม่มีสีเหลือง รวบรวมสารละลายสีเหลืองชั้นบนมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที จากนั้นละลายสารสกัดลูทีนที่ได้ด้วยเอทานอล แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ก่อนนำมากรองผ่าน syringe filter ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดแก้วเล็กสีชา จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสารสกัดลูทีนจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานลูทีนโดยใช้ HPLC

3.2.1.3 การหาปริมาณของสารสกัดลูทีนทั้งหมดจากรังไหมเหลืองด้วยวิธี HPLC

แยกและพิสูจน์องค์ประกอบสารสกัดลูทีนที่ได้จากการสกัดรังไหมเหลืองด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ในสภาวะที่บ่งชี้ด้วย HP 1120 Compact LC Series HPLC Systems model บริษัท Agilent Technologies ประเทศเยอรมันนี โดยใช้ *LiChrospher*® 100RP-18C (4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, 5 μ m) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมันนี เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และใช้สารละลายผสมอะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอล อัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตร (A) และเอทิลอะซิเตท (B) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (Injection volume) เท่ากับ 10 ไมโครลิตร ทำการแยกที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ระบบเกรเดียนต์ (gradient) โดยในช่วงเวลานาทีที่ 0 ถึง 15 15 ถึง 20 20 ถึง 25 และ 25 ถึง 40 ใช้ตัวทำละลาย B ร้อยละ 20 20 ถึง 50 50 ถึง 20 และคงที่ที่ร้อยละ 20 ตามลำดับ ใช้เวลาในการหยุดระหว่างตัวอย่าง (post-run) 2 นาที เปรียบเทียบเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time) ของโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ได้ คำนวณหาปริมาณโดยการหาพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานลูทีน (คัดแปลงจาก Kaewkumsan, 2009; Tsao, Yang, Young, Zhu, and Manolis, 2004)

3.2.2 ผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อความคงตัวของสารสกัดลูทีน

3.2.2.1 การทดสอบความคงตัวของลูทีน

ทดสอบความคงตัวของลูทีนจากรังไหมเหลืองและลูทีนทางการค้า โดยศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -80 -20 4 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ผลของวิตามินอีต่อความ

กึ่งตัวของลูทีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง และผลของแสงสว่างต่อความคงตัวของลูทีนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 48 สัปดาห์ ทำการสุ่มตัวอย่างตรวจสอบในสัปดาห์ที่ 1 2 4 7 19 และ 48 ตามลำดับ ใช้สารสกัดลูทีนในตัวทำละลายเอทานอลในการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ไมโครปิเปตแบ่งลงในขวดแก้วเล็กสีขาว และขวดแก้วเล็กใส (สำหรับการศึกษาอิทธิพลของแสงสว่าง) ขนาด 2 มิลลิลิตร ขวดละ 200 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่างที่ผสมวิตามินอี จะทำการผสมวิตามินอี 5 เท่าของความเข้มข้นของลูทีน จากนั้นทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ในแต่ละชุดตัวอย่างถูกแบ่งเป็น 10 กลุ่มตามอุณหภูมิและการให้แสงสว่าง ได้แก่ -80, -20, -20+Vit E, 4, 4+Vit E, 25, 25 (ได้รับแสง), 25+Vit E, 25+Vit E (ได้รับแสง) และ 40 องศาเซลเซียส ทำการบ่มในตู้บ่มตามอุณหภูมิที่กำหนด สำหรับตัวอย่างที่ 25 องศาเซลเซียส ที่ได้รับแสงเก็บภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่มีความเข้มแสงเหนือพื้นผิวตัวอย่างเฉลี่ย 1,423 lux (วัดโดยเครื่องตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนต์, Daiichi, LM-507) ตลอดระยะเวลาการทดลอง ปริมาณลูทีนที่เปลี่ยนแปลงไปทำการตรวจวัดด้วย HPLC โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร และทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณลูทีน (ดัดแปลงจาก Aimjongjun et al., 2013; Kaewkumsan, 2009; Lin and Chen, 2005)

3.2.2.2 การศึกษาผลของปริมาณวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีน

ศึกษาผลของปริมาณวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนทางการค้า และลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยและสำโรง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำการสุ่มตัวอย่างตรวจสอบในสัปดาห์ที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ ใช้สารสกัดลูทีนในตัวทำละลายเอทานอลในการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ไมโครปิเปตแบ่งลงในขวดแก้วเล็กสีขาวขนาด 2 มิลลิลิตร ขวดละ 200 ไมโครลิตร ทำการเติมวิตามินอี 1 2 และ 4 เท่าของความเข้มข้นของลูทีน จากนั้นทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ปริมาณลูทีนที่เปลี่ยนแปลงไปทำการตรวจวัดด้วย HPLC โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร และทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณลูทีน (ดัดแปลงจาก Aimjongjun et al., 2013; Kaewkumsan, 2009; Lin and Chen, 2005)

3.2.2.3 การหาปริมาณของลูทีนหลังการเก็บรักษา (Aman et al., 2004; Kaewkumsan, 2009)

นำตัวอย่างลูทีนจากการสุ่มทดสอบความคงตัวมาทำการละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงใน vial สีขาว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาแยกและพิสูจน์องค์ประกอบด้วย HP 1120 Compact LC Series HPLC Systems model บริษัท Agilent Technologies ประเทศเยอรมนี โดยใช้ C₃₀ carotenoid column (YMC; 4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 µm) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมนี

เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายผสมอะซิโตนไทรล์และเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตร (A) และ เอทิลอะซิเตท (B) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้เท่ากับ 10 ไมโครลิตร ทำการแยกที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ระบบเกรเดียนต์ โดยในช่วงเวลานาทีที่ 0 ถึง 1 1 ถึง 5 5 ถึง 10 10 ถึง 35 และ 35 ถึง 40 ใช้ตัวทำละลาย B ร้อยละ 10 10 ถึง 20 20 ถึง 20 ถึง 50 และคงที่ที่ร้อยละ 20 ตามลำดับ ใช้เวลาในการหยุดระหว่างตัวอย่าง 2 นาที เปรียบเทียบเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ของโครมาโตแกรมที่ได้ และคำนวณหาปริมาณโดยการหาพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานลูทีน

3.2.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วน (partition) (ดัดแปลงจาก Petrcek and Zechmeister, 1954)

นำสารสกัดหยาบลูทีนจากรังไหมเหลืองมาละลายด้วยเฮกเซน เดมน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บชั้นของสารละลายเฮกเซน ทำตามขั้นตอนเดิมโดยใช้เฮกเซนสกัดอีก 2 ครั้ง จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนลงในส่วนน้ำ และสกัดแยกจนกว่าส่วนน้ำจะไม่มีสีเหลือง ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยเอทานอล นำสารที่แยกได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) และ TLC

3.2.4 การแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004)

นำสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือง ลูทีนจากดอกดาวเรือง (ลูทีนทางการค้า) และสารมาตรฐานลูทีน ประมาณ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น TLC ซึ่งมีซิลิกาเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำการแยกแคะโรทีนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบโดยวางแผ่น TLC ลงใน developing tank ที่อิมด้วยตัวทำละลายผสมของเมทานอลร้อยละ 5 ในโทลูอีน เมื่อ developing solvent เคลื่อนที่ถึงขอบด้านบนที่กำหนดไว้ วัดระยะทางของแต่ละองค์ประกอบเคลื่อนที่ได้ คำนวณค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสาร เปรียบเทียบกับระยะทางที่สารมาตรฐานลูทีนเคลื่อนที่ได้ คำนวณค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารตามสมการดังนี้

ค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (R_f) = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

3.2.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

3.2.5.1 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เตรียมสารละลาย FRAP reagent (Benzie and Strain, 1996) โดยผสมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-

triazine, Acros Organic, New Jersey, USA) เพิ่มขึ้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮดรอกลอริก เพิ่มขึ้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) เพิ่มขึ้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารละลาย FRAP reagent ต้องเตรียมใหม่ และอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์ ปิเปตสารสกัดลูทีน 30 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 70 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย FRAP reagent 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร หาค่า FRAP value โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัส ซัลเฟตที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.1-1 มิลลิโมลาร์

3.2.5.2 วิธี Metal chelating activity assay (Giese et al., 2015)

ทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของสารสกัดลูทีนเข้มข้น 5 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารสกัดลูทีนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ (FeCl_2 , Acros Organic, New Jersey, USA) เพิ่มขึ้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามด้วยเมทานอลปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายเฟอร์โรซีน (ferrozine, Acros Organic, New Jersey, USA) เพิ่มขึ้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการแย่งจับกับโลหะดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{test sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

3.2.5.3 วิธี Scavenging activity of ABTS radical cation (ดัดแปลงจาก Re et al., 1999)

ทำการเตรียมสารละลาย ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, Fluka Chemical, Steinheim, Germany) เพิ่มขึ้น 7 มิลลิโมลาร์ และเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เพิ่มขึ้น 2.45 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเตรียมสารละลาย $\text{ABTS}^{+\cdot}$ โดยการผสมสารละลาย ABTS กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตในขวดสีชา เก็บไว้ในที่มืดนาน 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้งาน แล้วเจือจางสารละลาย $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.700 ± 0.02 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน)

ปิเปตสารสกัดลูทีนที่ละลายในเอทานอลปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง (เข้มข้น 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเติมสารละลาย $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำซ้ำตามวิธีการเดิมแต่ใช้เอทานอลปริมาตร 10 ไมโครลิตร แทนสารสกัดลูทีนเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม และใช้บีเอชเอ (Butylated hydroxyanisole; BHA, Sigma-Aldrich, Switzerland) และวิตามินซี (L-ascorbic acid, Carlo Erba, Rodano, Italy) เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงความสามารถในการต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยทำการวัดตามวิธีการที่ใช้ในการวัดตัวอย่างสารสกัดลูทีน จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{734 \text{ control}} - A_{734 \text{ test sample}}) / A_{734 \text{ control}}] \times 100$$

3.2.5.4 วิธี Scavenging activity of DPPH radical (ดัดแปลงจาก Brand-Williams et al., 1995)

นำสารสกัดลูทีนเข้มข้น 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชโดยเปิดสารสกัดลูทีนใส่ในหลอดทดลอง ผสมกับสารละลายดีพีพีเอช (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, Switzerland) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำซ้ำตามวิธีการเดิม แต่ใช้เมทานอลแทนสารสกัดลูทีนเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม และใช้บีเอชเอ (Butylated hydroxyanisole; BHA, Sigma-Aldrich, Switzerland) เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงความสามารถในการต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยทำการวัดตามวิธีการที่ใช้ในการวัดตัวอย่างสารสกัดลูทีน จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{test sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

3.2.5.5 วิธี Scavenging activity of Hydroxyl radical (ดัดแปลงจาก Halliwell, Gutteridge, and Aruoma, 1987)

เตรียมสารผสมในการทำปฏิกิริยาโดยเติม 2-deoxyribose (Acros Organic, New Jersey, USA) เข้มข้น 28 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl₃, Carlo Erba, Rodano, Italy) เข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Carlo Erba, Rodano, Italy) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) (Carlo Erba, Rodano, Italy) เข้มข้น 28 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิตามินซี เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และตัวอย่างลูทีน 100 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตร ด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ (pH 7.4) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หลังจากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid, Carlo Erba, Rodano, Italy) เข้มข้น 2.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกรดไทโอบาร์บิทริก (thiobarbituric acid, Sigma-Aldrich, Switzerland) เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด นาน 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำซ้ำตามวิธีการเดิมแต่ใช้น้ำปราศจากไอออนแทนสารสกัดลูทีนเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม และใช้เคออสติน (Quercetin, Sigma-Aldrich, Switzerland) เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการยับยั้งตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{test sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

3.2.6 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด (total phenolics) (Waterhouse, 2005)

เตรียมตัวอย่างสารสกัดลูทีนจากรังไหมที่ผ่านการทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 5 มิลลิลิตร แล้วเปิดสารสกัดลูทีน 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent (Carlo Erba, Rodano, Italy) และน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 และ 1580 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วเติม 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Carlo Erba, Rodano, Italy) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 120 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร หาค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid, Fluka Chemical, Steinheim, Germany) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 50-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS Inc., Illinois, USA) เวอร์ชัน 16.0 และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยพิจารณาที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของการหาปริมาณลูทีนทั้งหมดจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ คือ นางน้อย นางสาว นางคู่ และลำโรง

จากการหาปริมาณลูทีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ คือ นางน้อย นางสาว นางคู่ นางลาย และลำโรง โดยการสกัดลูทีนออกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากผลผลิตทั้งสองส่วน คือ รังไหมที่ผ่านการลอกกาไหมแล้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโปรตีนซีรีซิน (sericin solution) และคำนวณหาปริมาณลูทีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในรังไหมเหลืองด้วย HPLC พบว่าปริมาณลูทีนที่สกัดจากรังไหมทั้ง 5 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของรังไหมที่ผ่านการลอกกาไหมแล้ว ซึ่งรังไหมสายพันธุ์ลำโรง มีร้อยละของผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 0.050 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสายพันธุ์นางลาย นางน้อยและนางสาว และนางคู่ มีร้อยละของผลผลิตน้อยที่สุด โดยมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.047 0.042 0.041 และ 0.038 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) เห็นได้ว่าลูทีนส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของรังไหมเหลืองที่ผ่านการลอกกาไหมที่สกัดแยกซีรีซินออกบางส่วนแล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับลูทีนที่สกัดได้จากสารละลายโปรตีนซีรีซินซึ่งมีปริมาณน้อยกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลูทีนมีโครงสร้างที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เช่นเดียวกับแคโรทีนอยด์อื่น ๆ และกระบวนการลอกกาไหมใช้น้ำและความร้อน ทำให้ลูทีนส่วนใหญ่ยังติดอยู่กับเส้นใยไฟโบรอินจึงทำให้รังไหมเหลืองหลังผ่านกระบวนการลอกกาไหมจึงยังคงมีสีเหลืองเข้ม และหลังจากผ่านกระบวนการลอกกาไหม ทำให้โปรตีนซีรีซินซึ่งเป็น globular protein ที่ทำหน้าที่ยึดโครงสร้างของมัดโปรตีนไฟโบรอินเข้าด้วยกันถูกไฮโดรไลสออกบางส่วนส่งผลให้ชั้นของโปรตีนบนรังไหมมีโครงสร้างที่หลวมขึ้น (Gulrajani, Purwar, Prasad, and Joshi, 2009) เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดจึงสามารถสกัดลูทีนออกมาได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่า รังไหมเหลืองพันธุ์ลำโรงซึ่งมีสีเหลืองทองมากที่สุดมีลูทีนเป็นองค์ประกอบมากกว่าสายพันธุ์อื่น และสายพันธุ์นางคู่ที่มีรังสีเหลืองอ่อนมีลูทีนเป็นองค์ประกอบน้อยที่สุดเช่นกัน ดังนั้นอาจกล่าวระดับความเข้มสีของรังไหมสอดคล้องกับปริมาณลูทีนที่เป็นองค์ประกอบ โดยรังไหมที่มีสีเหลืองเข้มจะมีลูทีนเป็นองค์ประกอบมากกว่ารังไหมที่มีสีอ่อนกว่า

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของลูทีนทั้งหมดในสารสกัดจากรังไหมเหลืองที่ผ่านการลอกกาไหม และสารละลายโปรตีนซีรีซินที่ได้จากขั้นตอนการลอกกาไหมจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์

ชนิด	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม/100 กรัมของรังไหม)			%Yield
	สารละลายโปรตีนซีรีซิน	รังไหมที่ผ่านการลอกกาไหม	ปริมาณรวม	
นางน้อย	17.687±1.276	24.750±0.085	42.437 ^c ±1.311	0.042
นางคู่	12.163±0.491	25.739±1.401	37.902 ^d ±1.494	0.038
นางสาว	18.452±1.030	22.927±0.777	41.379 ^c ±1.618	0.041
นางลาย	18.770±0.969	27.893±0.894	46.662 ^b ±1.825	0.047
สำโรง	22.956±1.075	27.444±0.833	50.400 ^a ±1.660	0.050

หมายเหตุ: วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.2 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือง

4.2.1 ผลของอุณหภูมิ และแสงสว่างต่อความคงตัวของลูทีนจากต่างสายพันธุ์

เมื่อทำการศึกษาความคงตัวของลูทีนทางการค้า และลูทีนจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ โดยสารสกัดผ่านการทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 -20 4 25 องศาเซลเซียส ในที่ที่บแสง 25 องศาเซลเซียส ที่ได้รับแสง และ 40 องศาเซลเซียส นาน 48 สัปดาห์ พบว่าทั้งสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองและลูทีนทางการค้ามีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงสัปดาห์แรกของเก็บรักษา เมื่อเก็บรักษาต่อจนครบเวลา 48 สัปดาห์พบว่า ปริมาณ ลูทีนทางการค้าร้อยละ 14.68 14.73 และ 7.83 ยังคงอยู่หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 -20 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1 และตารางที่ ๑) เช่นเดียวกับลูทีนจากรังไหมเหลืองเมื่อเก็บครบ 48 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ -80 -20 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณลูทีนจากรังไหมพันธุ์นางน้อยเหลืออยู่ร้อยละ 10.969 7.871 และ 2.263 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ ๑) ร้อยละ 13.788 11.598 และ 8.249 ตามลำดับ ในรังไหมพันธุ์นางคู่ (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ ๑) ร้อยละ 12.448 11.242 และ 5.463 ตามลำดับ ในรังไหมพันธุ์นางสาว (ภาพที่ 4.4 และตารางที่ ๑) ร้อยละ 11.662 10.563 และ 8.8829 ตามลำดับ ในรังไหมพันธุ์นางลาย (ภาพที่ 4.5 และตารางที่ ๑) และร้อยละ 11.960 11.667 และ 0.593 ตามลำดับ ในรังไหมพันธุ์สำโรง (ภาพที่ 4.6 และตารางที่ ๑) จากการเปรียบเทียบปริมาณที่เหลือของลูทีนทางการค้า พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 และ -20 องศาเซลเซียส มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับลูทีนจาก

รังไหมเหลือผงสำหรับสำโรงและนางสาว ในขณะที่ลูทินจากรังไหมเหลือผงสำหรับนางน้อย นางคู่ และนางลาย พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทำให้มีปริมาณลูทินที่เหลือมากที่สุด รองลงมาคือ -20 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และสภาวะเร่ง (40 องศาเซลเซียส) พบว่าลูทินสลายตัวไปทั้งหมด ซึ่งมีแนวโน้มเหมือนกันทั้งลูทินทางการค้าและลูทินจากรังไหมเหลือทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ ๗1) แสดงให้เห็นว่าความร้อนเป็นปัจจัยเร่งการเสื่อมสลายของสารสกัดลูทินระหว่างการเก็บรักษา โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทินได้ดีที่สุดและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาลูทินทางการค้า ลูทินจากรังไหมเหลือผงสำหรับนางสาวและสำโรง คือ -80 และ -20 องศาเซลเซียส (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ภายใต้อุณหภูมิที่ปราศจากออกซิเจนในที่มืด แต่ในทางการค้าการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ช่วยประหยัดพลังงาน และค่าใช้จ่ายได้มากกว่า ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาลูทินจากรังไหมเหลือผงสำหรับนางน้อย นางคู่ และนางลาย คือ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสภายใต้อุณหภูมิที่ปราศจากออกซิเจนในที่มืด เนื่องจากช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทินได้มากที่สุด

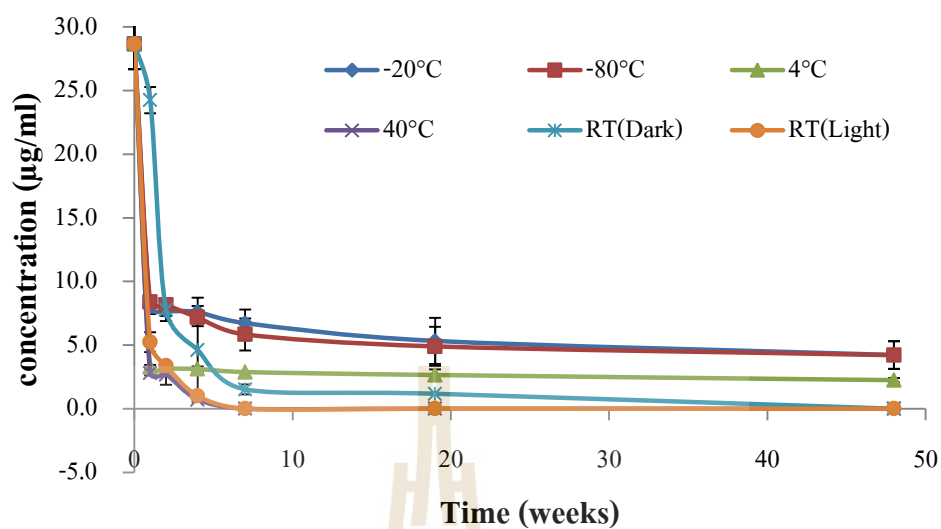
จากการศึกษาปัจจัยของแสงต่อความคงตัวของลูทินที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บภายใต้แสงสว่างทำให้ค่าเฉลี่ยของลูทินทางการค้าและลูทินจากรังไหมเหลือผงสำหรับสำโรงลดลงมากกว่าการเก็บในที่มืดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่ไม่ส่งผลต่อค่าเฉลี่ยของลูทินจากรังไหมสายพันธุ์นางน้อย นางคู่ นางสาว และนางลาย แต่เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ทำให้ลูทินสลายตัวหมดไปการเก็บรักษาภายใต้แสงสว่างจะใช้เวลาสั้นกว่าการเก็บในที่มืด ซึ่งเมื่อเก็บรักษาลูทินจากรังไหมเหลือผงสำหรับนางน้อยภายใต้แสงสว่างลูทินจะสลายตัวหมดไปในสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่การเก็บรักษาในที่มืดจะสลายตัวหมดไปในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนลูทินจากรังไหมเหลือผงสำหรับนางลายและนางสาวจะสลายตัวหมดไปในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อเก็บรักษาภายใต้แสงสว่าง และสัปดาห์ที่ 7 เมื่อเก็บในที่มืด เช่นเดียวกับลูทินจากรังไหมเหลือผงสำหรับนางคู่ที่จะสลายตัวหมดไปในสัปดาห์ที่ 4 และ 19 ตามลำดับ (ตารางที่ ๗1) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าแสงสว่างเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของลูทิน สอดคล้องกับการศึกษาโดย Shi and Chen (1997) ที่พบว่า แสงสว่าง และอุณหภูมิสูงมีผลทำให้ลูทินสลายตัวอย่างรวดเร็ว ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถชะลอการสลายตัวของลูทินได้ทั้งในสารละลายลูทินมาตรฐาน และลูทินที่สกัดจากสาหร่าย และจากการศึกษาโดย Tang and Chen (2000) แสดงให้เห็นว่าอัลฟาแคโรทีน เบต้าแคโรทีน และลูทินในเนื้อแครอทที่ผ่านการทำแห้งแบบการแช่เยือกแข็งมีปริมาณลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาการได้รับแสง อย่างไรก็ตามอัตราการเสื่อมสลายของลูทินอาจลดลงเมื่อความเข้มแสงลดลง เนื่องจากพลังงานกระตุ้นที่สารสกัดลูทินได้รับจากแสงสว่างจะมีค่าลดลง ทำให้ปฏิกิริยา photooxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของการสลายตัวของลูทินเกิดขึ้นน้อยลง หรืออาจเกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาที่

ต่ำลง ทำให้การเสื่อมสลายของลูทีนเกิดขึ้นช้าลงด้วย สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Chen et al. (1994) และ Pesek and Warthesen (1990) ซึ่งรายงานถึงการเกิด isomerization และการเสื่อมสลายของแคโรทีนอยด์เมื่ออยู่ในสภาวะที่ได้รับแสงสว่าง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนในผงข้าวโพดหวานและพบว่าปริมาณลูทีนลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อผงข้าวโพดหวานสัมผัสกับอากาศ แสงสว่าง และอุณหภูมิสูง โดยพลังงานก่อกัมมันต์ (activation energy, E_a) ของการเก็บภายใต้สุญญากาศในที่มีค่านี้น้อยกว่าการเก็บภายใต้สุญญากาศภายใต้แสงสว่าง และค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายจะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 4 องศาเซลเซียสเป็น 20 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ ในขณะที่ค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายในสภาวะการเก็บภายใต้สุญญากาศในที่มีค่านี้น้อยที่สุด รองลงมาคือ การเก็บโดยสัมผัสกับอากาศในที่มืด ภายใต้สุญญากาศในที่สว่าง และสัมผัสกับอากาศในที่สว่าง ตามลำดับ (Li et al., 2014) เช่นเดียวกับการศึกษาอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนจากฝรั่งไหมเหลืองที่พบว่า ค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิต่ำ (-80 -20 และ 4 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) โดยมีแนวโน้มที่เหมือนกันทั้งในลูทีนทางการค้าและฝรั่งไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ จากการวิจัยที่ผ่านมา รวมทั้งการศึกษาผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อความคงตัวของลูทีนจากฝรั่งไหมเหลือง สามารถสรุปได้ว่าความร้อนและแสงสว่างเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความคงตัวของลูทีน โดยความร้อนส่งผลต่อการสลายตัวของลูทีนมากกว่าแสงสว่าง

เมื่อเปรียบเทียบความคงตัวของลูทีนทางการค้า และฝรั่งไหมเหลืองแต่ละสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.7 และ ตารางที่ ๒2) พบว่าในสัปดาห์แรกของการเก็บรักษาปริมาณลูทีนทางการค้าลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ ลูทีนจากฝรั่งไหมสายพันธุ์นางคู่และนางลาย และลูทีนจากฝรั่งไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อย นางลิ้ว และลำโพงมีการลดลงของลูทีนน้อยที่สุด เมื่อเก็บจนครบ 48 สัปดาห์พบว่าปริมาณลูทีนที่คงอยู่ของลูทีนทางการค้ามีค่าน้อยที่สุดคือ ร้อยละ 14.68 ในขณะที่ลูทีนจากฝรั่งไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีปริมาณลูทีนที่คงอยู่มากกว่าลูทีนทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.8 และ ตารางที่ ๒3) ในสัปดาห์ที่ 48 มีแนวโน้มไม่ต่างกันมากกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส คือ ฝรั่งไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีปริมาณลูทีนที่คงอยู่มากกว่าลูทีนทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันในระหว่างสายพันธุ์ โดยที่ ลูทีนจากฝรั่งไหมเหลืองสายพันธุ์ลำโพง นางลาย และนางลิ้วมีการเสื่อมสลายของลูทีนน้อยที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์นางคู่ ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนที่ลดลงไม่แตกต่างจากสายพันธุ์นางลิ้วและนางลาย รวมถึงนางน้อยซึ่งมีปริมาณลูทีนที่คงอยู่น้อยที่สุดในสัปดาห์แรกของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.9 และ ตารางที่ ๒4) พบว่าลูทีน จากฝรั่งไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการลดลงของปริมาณลูทีนน้อยกว่าลูทีนทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีปริมาณลูทีนที่

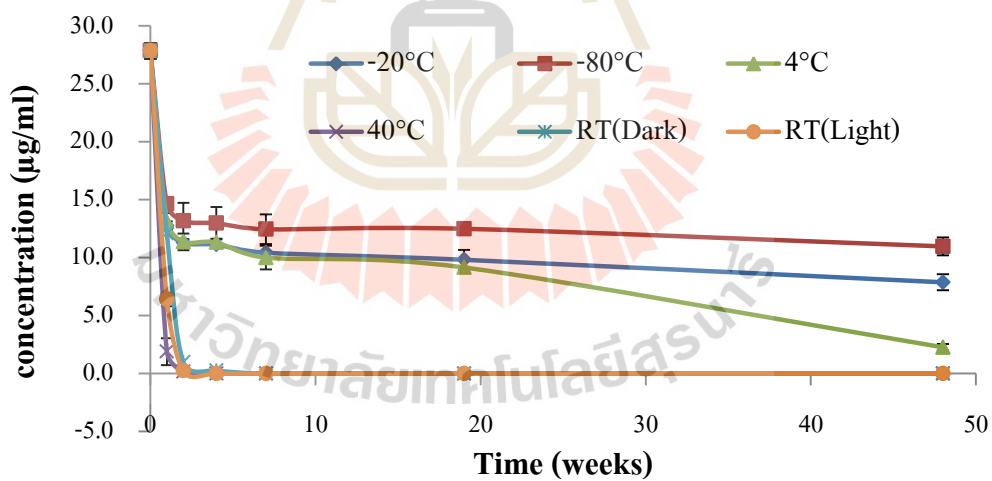
คงอยู่มากกว่าถึง 3.14 เท่าและแนวโน้มยังเหมือนเดิมเมื่อผ่านการเก็บนาน 19 สัปดาห์ หลังจากนั้นเมื่อเก็บครบ 48 สัปดาห์พบว่า ลูกทินจากรังไหมพันธุ์สำโรงมีปริมาณที่คงอยู่น้อยกว่าลูกทินทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบลูกทินจากรังไหมระหว่างสายพันธุ์ พบว่า ลูกทินจากรังไหมนางลายมีร้อยละของปริมาณลูกทินที่คงอยู่มากที่สุด คือ 30.66 รองลงมาคือสายพันธุ์นางคู่ นางล้วน นางน้อยและสำโรงตามลำดับ ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 4.10 และ ตารางที่ ๗5) พบว่า ลูกทินทางการค้ามีร้อยละของปริมาณที่คงอยู่มากกว่าลูกทินจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของปริมาณ ลูกทินที่คงอยู่ของรังไหมทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์พบว่า รังไหมเหลืองพันธุ์นางล้วน นางคู่ และนางลายมีการเสื่อมสลายของลูกทินน้อยกว่าสายพันธุ์นางน้อยและสำโรง แต่ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 สัปดาห์ก็สลายตัวไปทั้งหมด

เมื่อเปรียบเทียบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณลูกทินในสารสกัดจากรังไหมเหลืองกับลูกทินทางการค้า พบว่าลูกทินจากรังไหมเหลืองมีความคงตัวมากกว่าในอุณหภูมิต่ำ (4 - (-80) องศาเซลเซียส) จากการแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูกทินจากรังไหมเหลืองด้วยวิธี TLC (ข้อ 4.4) พบว่า สารสกัดลูกทินจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน คือ มีแถบสารจำนวน 5 แถบปรากฏบนแผ่น TLC เหมือนกันในทุกสายพันธุ์ และจากการสกัดแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนของสารสกัดลูกทินจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย พบว่า สารสกัดดังกล่าวมีแก๊ซเป็นส่วนประกอบ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดลูกทินจากสายพันธุ์ที่เหลืออีก 4 สายพันธุ์มีแก๊ซเป็นองค์ประกอบเช่นกัน ซึ่งแก๊ซที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดลูกทินจากรังไหมเหลืองซึ่งอาจช่วยลดการสัมผัสกับอากาศในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง (Aimjongjun et al., 2013) นอกจากนี้จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด (ข้อ 4.6) พบว่า ลูกทินจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าลูกทินทางการค้ามากกว่า 15 เท่าในทุกสายพันธุ์ มีการศึกษาความคงตัวของสารฟีนอลิกในกาแฟพบว่า ในสภาวะการเก็บรักษาแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปริมาณสารฟีนอลิกในกาแฟไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้นตลอดระยะเวลาการเก็บนาน 6 เดือน (Vicente, Queiroz, Gotlieb, and Torres, 2010) และการศึกษาความคงตัวของสารฟีนอลิกในสมุนไพร 8 ชนิด โดย Materska (2010) พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บในช่วง 3 เดือนแรก และหลังจากนั้นจะคงตัวจนครบระยะเวลาการเก็บรักษานาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แม้จะมีแนวโน้มการเสื่อมสลายที่เหมือนกัน แต่สารฟีนอลิกในสมุนไพรแต่ละชนิดจะมีปริมาณการเสื่อมสลายต่างกัน จะเห็นได้ว่าสารฟีนอลิกเป็นสารที่ค่อนข้างมีความคงตัวสูง แม้ว่าจะไม่มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลิกต่อความคงตัวของแคโรทีนอยด์ แต่อาจเป็นไปได้ว่าสารฟีนอลิกช่วยให้ลูกทินจากรังไหมเหลืองมีความคงตัวสูงกว่าลูกทินทางการค้าที่อุณหภูมิต่ำ (-80 และ -20 องศาเซลเซียส)



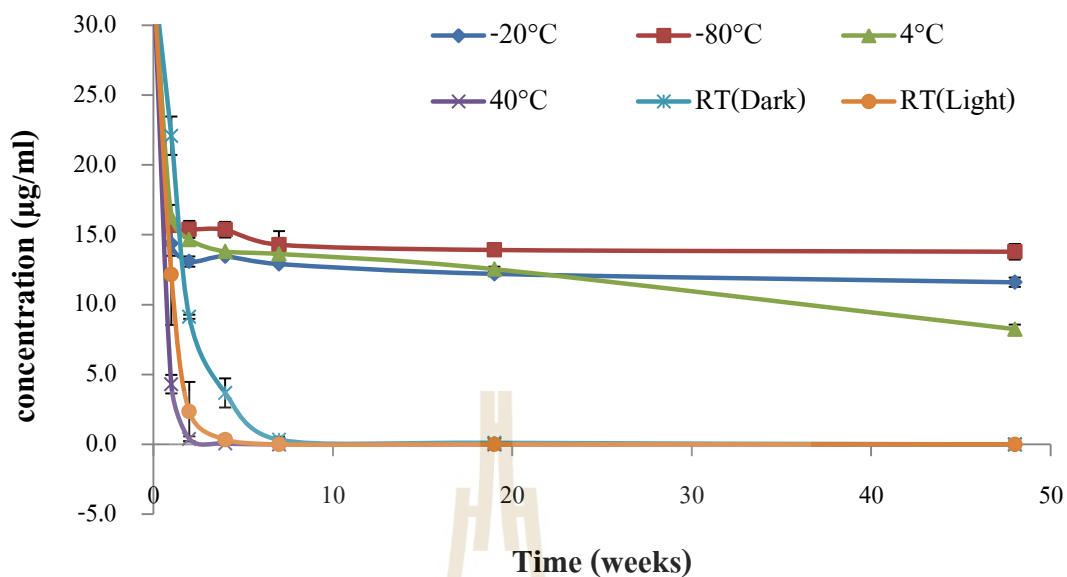
ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนทางการค้าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

หมายเหตุ: RT คือ อุณหภูมิห้อง

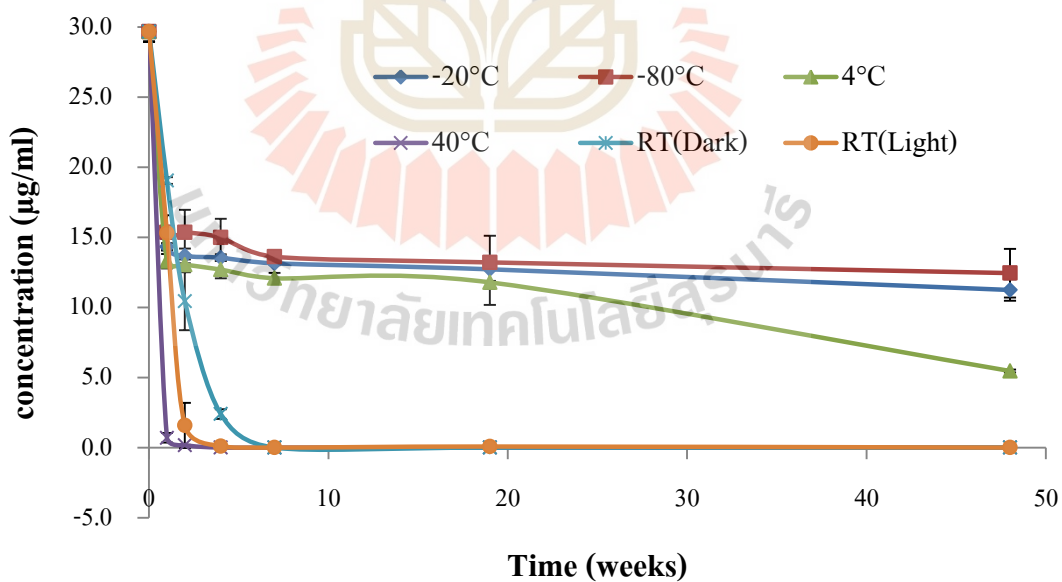


ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากโรงงานสายพันธุ์นางน้อยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

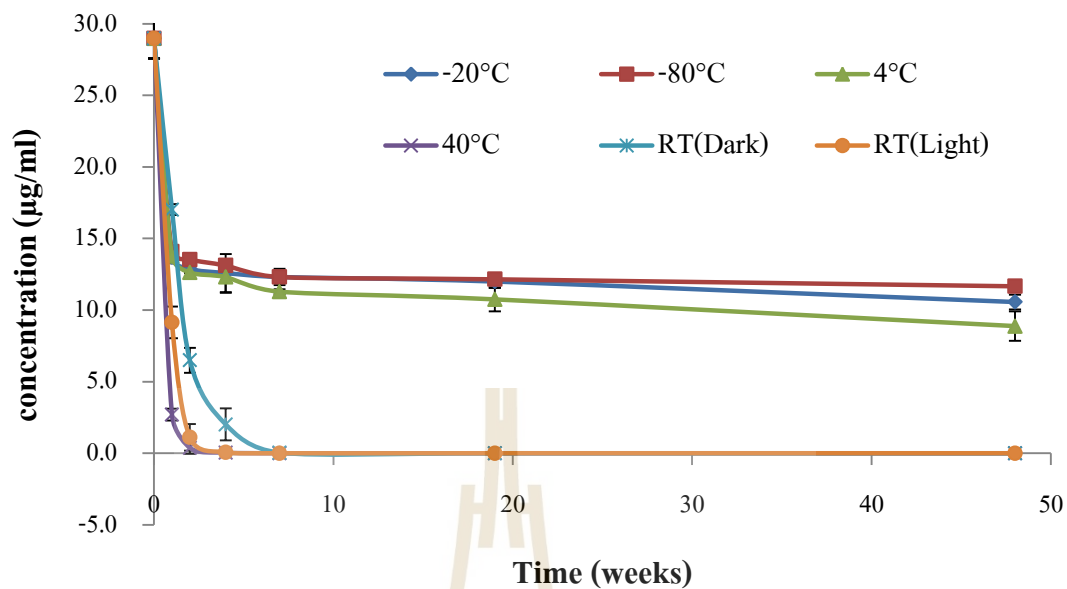
หมายเหตุ: RT คือ อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากฝรั่งไหมสายพันธุ์นางต๋อยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ
หมายเหตุ: RT คือ อุณหภูมิห้อง

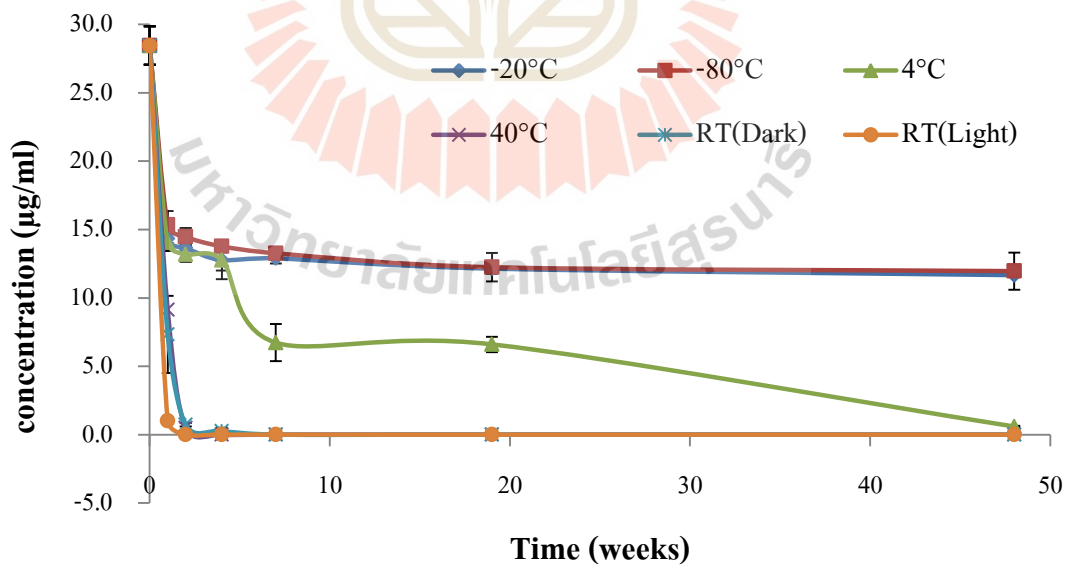


ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากฝรั่งไหมสายพันธุ์นางสั่วเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ
หมายเหตุ: RT คือ อุณหภูมิห้อง



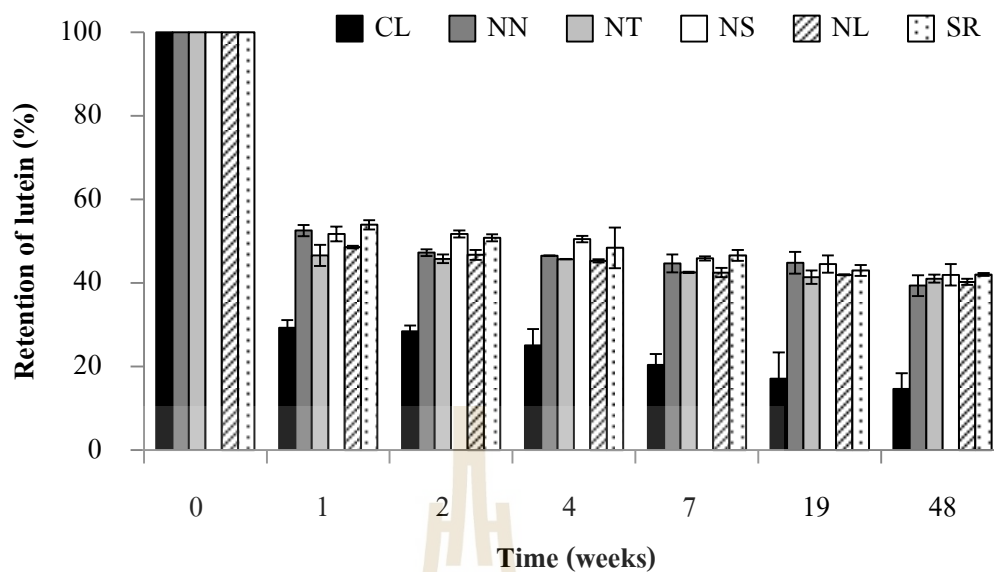
ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากรงไหมสายพันธุ์นางลายเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ
ต่าง ๆ

หมายเหตุ: RT คือ อุณหภูมิห้อง



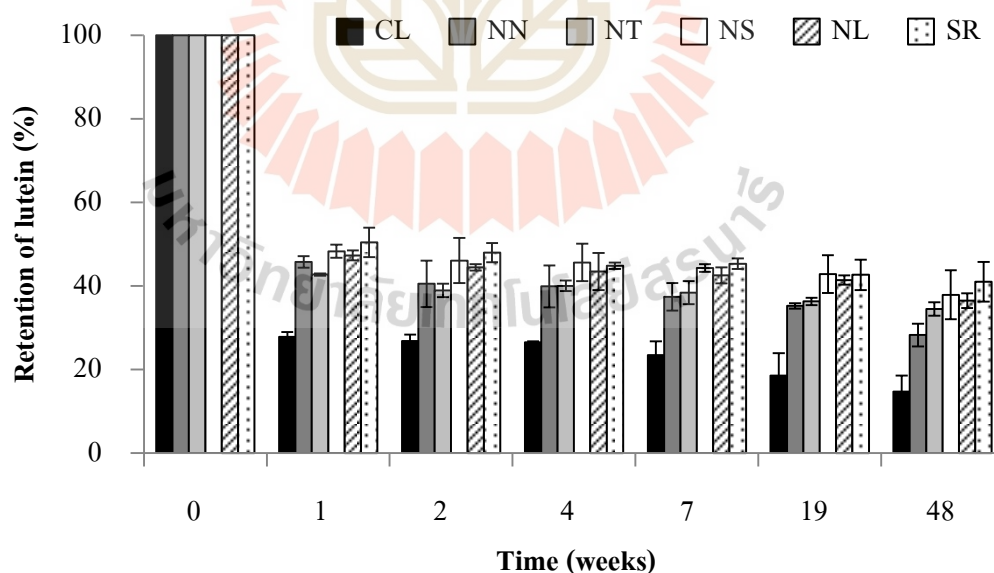
ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนจากรงไหมสายพันธุ์สำโรงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

หมายเหตุ: RT คือ อุณหภูมิห้อง



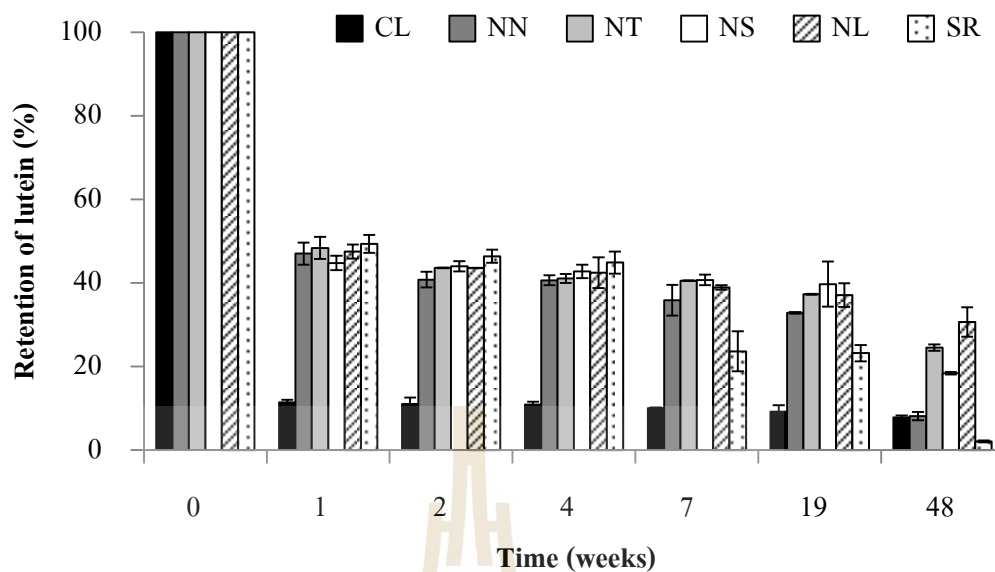
ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: CL NN NT NS NL และ SR คือ ลูทีนทางการค้า ลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์ นางน้อย นางคู่ย นางสี่ว นางลาย สำโรง ตามลำดับ



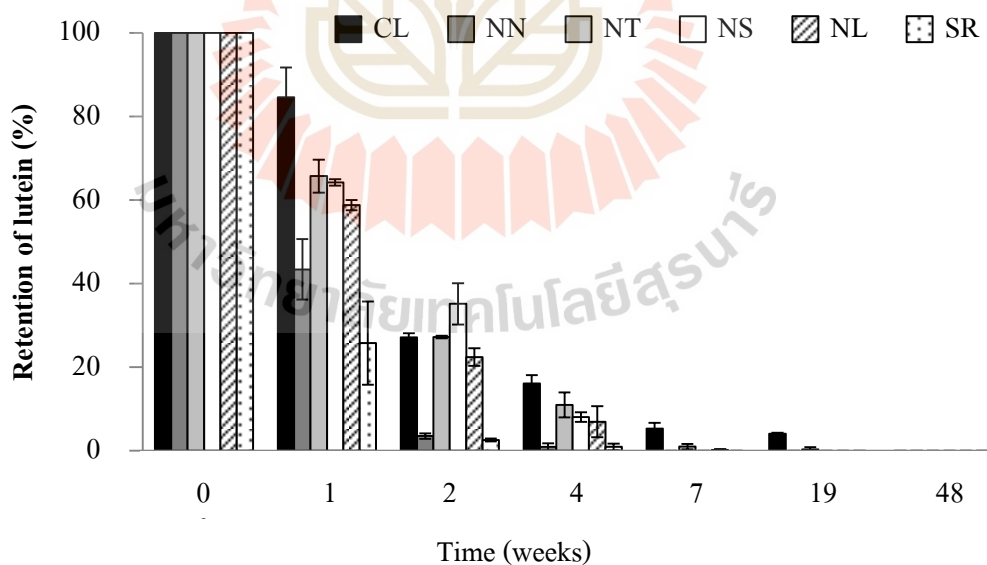
ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: CL NN NT NS NL และ SR คือ ลูทีนทางการค้า ลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์ นางน้อย นางคู่ย นางสี่ว นางลาย สำโรง ตามลำดับ



ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: CL NN NT NS NL และ SR คือ ลูทีนทางการค้า ลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อย นางดู่ นางลิ้ว นางลาย ลำโรง ตามลำดับ



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

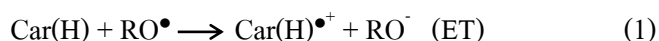
หมายเหตุ: CL NN NT NS NL และ SR คือ ลูทีนทางการค้า ลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อย นางดู่ นางลิ้ว นางลาย ลำโรง ตามลำดับ

4.2.2 การศึกษาความคงตัวเชิงจลนศาสตร์ของลูทีน

จากการศึกษาอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ในช่วงระยะเวลา 48 สัปดาห์พบว่า ผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อการลดลงของปริมาณลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องทั้งที่ได้รับแสง และไม่ได้รับแสง รวมถึงในสภาวะเร่งสอคล้องกับปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึม (logarithm) ของความเข้มข้นของลูทีนที่เปลี่ยนแปลงไปกับระยะเวลาการเก็บเป็นแบบเส้นตรง สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Tang and Chen (2000) พบว่าอุณหภูมิสูงมีผลต่อการเสื่อมสลาย และการเกิดไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของลูทีนในรูปทรานส์ทั้งหมด (all-trans-lutein) โดยลูทีนรูปทรานส์ทั้งหมดดังกล่าวจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ 13-cis-lutein และ 9-cis-lutein เมื่อเก็บรักษาในที่มืด และจะมีปริมาณสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้แอลฟาแคโรทีนและเบต้าแคโรทีนยังมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือ เปลี่ยนจากรูปทรานส์ทั้งหมดไปอยู่ในรูปของ cis โดยอัตราการเสื่อมสลายของลูทีน เบต้า และแอลฟาแคโรทีนเป็นไปตามจลนศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chen and Huang (1998) ที่พบว่า ความร้อนส่งผลให้เบต้าแคโรทีนในรูปทรานส์ทั้งหมด (all-trans- β -carotene) เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ 13-cis- β -carotene และ 13, 15-di-cis-lutein- β -carotene ซึ่งการเสื่อมสลายของเบต้าแคโรทีนเป็นไปตามจลนศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง

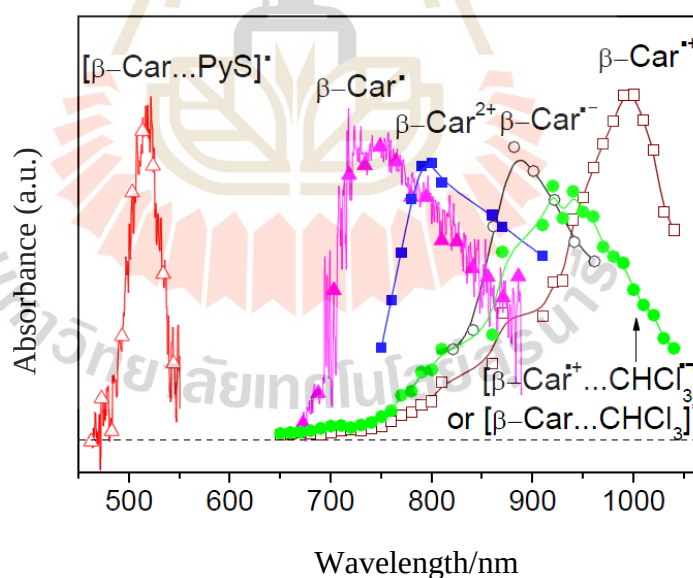
จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการลดลงของปริมาณลูทีนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสมีค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายสูงสุด รองลงมาคือ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสงสว่าง และที่มืดตามลำดับ โดยแนวโน้มดังกล่าวเหมือนกันทั้งผลของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลือง ในขณะที่ค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนทางการค้าจะน้อยกว่าลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ในทุกอุณหภูมิ เมื่อทำนายอายุการเก็บของสารสกัดลูทีนจากค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) จึงพบว่า ลูทีนทางการค้าสามารถเก็บได้นานกว่าลูทีนจากรังไหมเหลือง โดยมีค่าครึ่งชีวิตของลูทีนทางการค้าเท่ากับ 0.85-4.96 และ 0.89 สัปดาห์ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องในที่มืด และได้รับแสงตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (-80 -20 และ 4 องศาเซลเซียส) พบว่า ในช่วง 2 สัปดาห์แรกลูทีนมีการเสื่อมสลายอย่างรวดเร็ว และหลังจากนั้นปริมาณลูทีนมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อยจนครบ 48 สัปดาห์ โดยในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษาค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนมากกว่าการเก็บในช่วงสัปดาห์ที่ 3-48 ซึ่งการเก็บรักษาลูทีนทางการค้าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในช่วง 2 สัปดาห์แรกมีค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายเท่ากับ 1.1019 มากกว่าช่วงสัปดาห์ที่ 3-48 (0.0069) คิดเป็น 159.7 เท่า เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส มีค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายในช่วง 2 สัปดาห์แรกมากกว่าสัปดาห์ที่ 3-48 คิดเป็น 53.1 และ 61.0 เท่า ตามลำดับ ส่วนลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยมีค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายในช่วง 2 สัปดาห์แรกมากกว่าสัปดาห์

ที่ 3-48 คิดเป็น 12.3 61.1 และ 107.1 เท่าที่อุณหภูมิ 4 -20 และ -80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ คิดเป็น 34.5 157.2 และ 195.3 เท่า ในรังไหมพ่นฐานางค์ ตามลำดับ คิดเป็น 21.3 94.4 และ 99.8 เท่า ในรังไหมพ่นฐานางค์ ตามลำดับ คิดเป็น 61.9 103.9 และ 181.2 เท่า ในรังไหมพ่นฐานางค์ ตามลำดับ และคิดเป็น 5.8 166.8 และ 116.6 เท่า ในรังไหมพ่นฐานางค์ ตามลำดับ จึงอาจสรุปได้ว่าการเสื่อมสลายของสารสกัดจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ และลูทีนทางการค้าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีลักษณะเป็น Two-stage first-order kinetics ซึ่งมีกลไกรายงานจากการศึกษาการเสื่อมสลายของแคโรทีนอยด์ในระบบที่มีความชื้นต่ำ (low moisture) ระบบที่ศึกษาในตัวทำละลาย (solvent-based model systems) และระบบที่เป็นน้ำมัน (oil system) (Bezbradica, Milic-askrabic, Petrovic, and Siler-marinkovic, 2004) จลศาสตร์ลักษณะนี้การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นเร็วในช่วงแรก และช้าในช่วงที่สอง จากการศึกษาพบว่าค่าคงที่ของการเสื่อมสลายในช่วงแรกสูงกว่าอัตราค่าคงที่ในช่วงที่สองซึ่งมีแนวโน้มเหมือนกันทั้งลูทีนจากรังไหมเหลืองและลูทีนทางการค้า (ตารางที่ 4.2) สาเหตุของการเสื่อมสลายเชิงจลนศาสตร์ (kinetic degradation) นี้เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย อาทิตัวกลางของการเกิดปฏิกิริยา (reaction medium) อุณหภูมิ สถานะทางกายภาพ (physical state) และชนิดหรือโครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์ ตลอดจนสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ โดยกลไกการเสื่อมสลายจาก autooxidative activity ส่วนใหญ่มักเกิดจากเปอร์ออกไซด์ (peroxides) หรืออนุมูลอิสระที่มีพลังงานสูง (high-energy radicals) ที่อาจพบตามธรรมชาติในรังไหม และ/หรือถูกสะสมอยู่จากขั้นตอนการสกัด ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการกระตุ้นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (autooxidation) ในช่วงแรกของการเก็บรักษาทำให้ปริมาณของแคโรทีนอยด์ลดลงอย่างรวดเร็ว (Bezbradica et al., 2004; Subagio and Morita, 2003) และเมื่อ radicals ดังกล่าวถูกระงับให้มีระดับพลังงานที่ต่ำลงจนไม่สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้แล้ว ลูทีนจึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่มีพลังงานต่ำ (low-energy radicals) ได้ ซึ่งจะเข้าสู่ slower stage ของการเสื่อมสลายในช่วงที่สอง Han, Zhang, and Skibsted (2012) รายงานถึงปฏิกิริยาของแคโรทีนอยด์เมื่อดักจับอนุมูลอิสระว่าอาจมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



โดยปฏิกิริยาที่ (1) เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer) ปฏิกิริยาที่ (2) และ (3) เกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบแอดดักต์ของอนุมูลอิสระ (radical adduct formation) และการถ่ายทอดไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom transfer) ตามลำดับ จากการศึกษาความสามารถใน

การต้านอนุมูลอิสระของลูทีนทางการค้าและลูทีนรังไหมเหลือง (ข้อ 4.5) พบว่าลูทีนมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กจากการทดสอบด้วยวิธี FRAP และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช เอบีทีเอส และไฮดรอกซิล แสดงว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเหล่านี้ของลูทีนเกี่ยวข้องกับกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และไฮโดรเจนอะตอม สอดคล้องกับปฏิกิริยาที่ (1) และ (3) นอกจากนี้จากภาพที่ 4.11 พบว่าเบต้าแคโรทีนที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-1000 นาโนเมตร ซึ่งจากเดิมดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (Prince, LaMuraglia, and MacNichol, 1988) จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเมื่อลูทีนทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดจากออกซิเจนซึ่งถูกสะสมมาจากระดับของการสกัด ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของลูทีนเหล่านั้นเปลี่ยนไปและไม่สามารถวิเคราะห์ได้ที่ค่าการดูดกลืนแสงเดิมที่ 445 นาโนเมตร ส่งผลให้ปริมาณลูทีนในช่วงแรกลดลงอย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับลักษณะปรากฏของลูทีนที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากเดิมลูทีนสามารถดูดกลืนแสงสีน้ำเงินที่มีพลังงานสูงได้ทำให้ลูทีนมีลักษณะปรากฏเป็นสีส้ม และหลังจากทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทำให้ช่วงของการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไปลักษณะที่ปรากฏจึงมีสีเปลี่ยนไปด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 4.11 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของเบต้าแคโรทีนหลังจากทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ
ที่มา: Han, Zhang, and Skibsted, 2012

ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าสารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้มีความคงตัวมากกว่าลูทีนทางการค้า และเป็นสาเหตุหนึ่งของความ

แตกต่างของความคงตัวของสายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลูทีนและสารฟีนอลิกมีการออกฤทธิ์แบบเสริมกันในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant synergism) มีรายงานถึงการทำงานร่วมกันของพูเออราริน (puerarin) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก กับเบต้าแคโรทีนในไลโปโซม (liposomes) พบว่า พูเออรารินสามารถฟื้นฟูอนุมูลเบต้าแคโรทีนให้เป็นเบต้าแคโรทีนได้อย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Han et al., 2012)



จากปฏิกิริยาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์แบบเสริมกันต่อการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant synergism) ของฟลาโวนอยด์กับแคโรทีนอยด์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าการออกฤทธิ์แบบเป็นปฏิปักษ์ (antioxidant antagonism) ระหว่างเบต้าแคโรทีนและ (-)-epicatechin (-)-epigallocatechin (-)-epicatechin gallate และ (-)-epigallocatechin gallate ในชา ซึ่งทั้งเบต้าแคโรทีนและสารฟีนอลิกในชาต่างก็ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Song et al., 2011) ดังนั้นสารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของความแตกต่างของความคงตัวของสายพันธุ์ก็ได้

จากการคำนวณหาพลังงานกระตุ้นโดย Arrhenius plots พบว่า ลูทีนทางการค้ามีพลังงานกระตุ้นของการเก็บรักษาในช่วง 2 สัปดาห์แรก (2.263 กิโลจูลต่อโมล) สูงกว่าสัปดาห์ที่ 3-48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.222 กิโลจูลต่อโมล ในขณะที่ลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ มีพลังงานกระตุ้นของการเก็บรักษาในช่วง 2 สัปดาห์แรกต่ำกว่าสัปดาห์ที่ 3-48 คือ มีพลังงานกระตุ้นของการเก็บรักษาในช่วง 2 สัปดาห์แรกเท่ากับ 1.031 0.572 1.146 0.450 และ 0.642 กิโลจูลต่อโมล ในลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย นางดู่ นางลิ้น นางลาย และสำโรง ตามลำดับ และมีพลังงานกระตุ้นของการเก็บรักษาช่วงสัปดาห์ที่ 3-48 เท่ากับ 10.465 8.288 7.251 5.620 และ 11.612 กิโลจูลต่อโมล ในลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย นางดู่ นางลิ้น นางลาย และสำโรง ตามลำดับ

เมื่อทำนายอายุการเก็บของสารสกัดลูทีนจากค่าครึ่งชีวิต พบว่า ค่าครึ่งชีวิตของลูทีนทางการค้าเท่ากับ 55.90 และ 67.30 สัปดาห์ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิตของลูทีนจากรังไหมเหลืองพบว่า ลูทีนจากรังไหมพันธุ์นางน้อยที่อุณหภูมิ 4 -20 และ -80 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 18.94 93.67 และ 198.04 สัปดาห์ ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์นางดู่มีค่าเท่ากับ 57.76 231.05 และ 385.08 สัปดาห์ ตามลำดับ พันธุ์นางลิ้นมีค่าเท่ากับ 35.91 169.06 และ 210.04 สัปดาห์ ตามลำดับ พันธุ์นางลายมีค่าเท่ากับ 103.45 177.73 และ 330.07 สัปดาห์ ตามลำดับ และพันธุ์สำโรง มีค่าเท่ากับ 10.58 315.07 และ 239.02 สัปดาห์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาลูทีนโดยมีความเข้มข้นคงเหลือร้อยละ 50 ได้นานที่สุด รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส

ตามลำดับ ในลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ ยกเว้นพันธุ์สำโรงซึ่งค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เนื่องจากอัตราค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมีค่าต่ำกว่า แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับอัตราค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายในช่วงที่แรก พบว่า ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมีค่าต่ำกว่า (ตารางที่ 4.2) ทำให้ปริมาณลูทีนคงเหลือไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ พ1) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 และ -20 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากออกซิเจน ในที่มีดเป็นสภาวะที่เหมาะสม แต่เมื่อพิจารณาในทางการค้าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสถือว่าเหมาะสมที่สุด เนื่องจากใช้พลังงานน้อยและประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าที่ -80 องศาเซลเซียส



ตารางที่ 4.2 เวลาครึ่งชีวิต พลังงานก่อกัมมันต์ และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทีนและสภาวะการเก็บที่สภาวะแตกต่างกัน

Strain	Order	Temp. (°C)	Storage condition	Regression equation ($\ln CA = -kt + \ln CA_0$)	k	R ²	Half- life ($t_{1/2}$)		Ea (kJ mol ⁻¹)
							(weeks)	(years)	
Commercial lutein	First stage	4	Dark	$y = -1.1019x + 2.9993$	1.1019	0.7613	0.63	-	2.263
	first order	-20	Dark	$y = -0.6584x + 3.1487$	0.6584	0.7716	1.05	-	
		-80	Dark	$y = -0.6287x + 3.1558$	0.6287	0.7677	1.10	-	
	Second stage	4	Dark	$y = -0.0069x + 1.1286$	0.0069	0.9574	-	-	1.222
	first order	-20	Dark	$y = -0.0124x + 2.0044$	0.0124	0.9233	55.90	1.16	
		-80	Dark	$y = -0.0103x + 1.8906$	0.0103	0.8074	67.30	1.40	
	First order	40	Dark	$y = -0.8146x + 2.6879$	0.8146	0.8262	0.85	0.02	-
		25	Dark	$y = -0.1398x + 2.3596$	0.1398	0.6736	4.96	0.10	
		25	Light	$y = -0.7767x + 2.9183$	0.7767	0.9156	0.89	0.02	
Nang Noi	First stage	4	Dark	$y = -0.4484x + 3.2249$	0.4484	0.8656	1.55	-	1.031
	first order	-20	Dark	$y = -0.4518x + 3.217$	0.4518	0.8491	1.53	-	
		-80	Dark	$y = -0.3749x + 3.2375$	0.3749	0.8541	1.85	-	
	Second stage	4	Dark	$y = -0.0366x + 2.6529$	0.0366	0.9488	18.94	0.39	10.465
	first order	-20	Dark	$y = -0.0074x + 2.4196$	0.0074	0.9859	93.67	1.95	
		-80	Dark	$y = -0.0035x + 2.5691$	0.0035	0.9298	198.04	4.13	

ตารางที่ 4.2 เวลาครึ่งชีวิต พลังงานก่อกัมมันต์ และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทินและสภาวะการเก็บที่สภาวะแตกต่างกัน (ต่อ)

Strain	Order	Temp. (°C)	Storage condition	Regression equation ($\ln CA = -kt + \ln CA_0$)	k	R ²	Half- life ($t_{1/2}$)		Ea (kJ mol ⁻¹)
							(weeks)	(years)	
Nang Noi	First order	40	Dark	$y = -2.5574x + 3.2826$	2.5574	0.9991	0.27	0.01	-
		25	Dark	$y = -1.2208x + 3.2535$	1.2208	0.9281	0.57	0.01	
		25	Light	$y = -2.3821x + 3.6307$	2.3821	0.9535	0.29	0.01	
Nang Tui	First stage first order	4	Dark	$y = -0.4147x + 3.411$	0.4147	0.8418	1.67	-	0.572
		-20	Dark	$y = -0.4716x + 3.3887$	0.4716	0.8236	1.47	-	
		-80	Dark	$y = -0.3906x + 3.3902$	0.3906	0.7665	1.77	-	
	Second stage first order	4	Dark	$y = -0.012x + 2.702$	0.012	0.9766	57.76	1.20	8.288
		-20	Dark	$y = -0.003x + 2.5864$	0.003	0.8792	231.05	4.81	
		-80	Dark	$y = -0.0018x + 2.6962$	0.002	0.5177	385.08	8.02	
	First order	40	Dark	$y = -1.5566x + 3.0527$	1.5566	0.9477	0.45	0.01	-
		25	Dark	$y = -0.2969x + 2.7731$	0.2969	0.8236	2.33	0.05	
		25	Light	$y = -1.176x + 3.5182$	1.176	0.9889	0.59	0.01	
Nang Sew	First stage first order	4	Dark	$y = -0.4107x + 3.2594$	0.4107	0.7664	1.69	-	1.146
		-20	Dark	$y = -0.3872x + 3.2768$	0.3872	0.795	1.79	-	
		-80	Dark	$y = -0.3295x + 3.2804$	0.3295	0.7496	2.10	-	

ตารางที่ 4.2 เวลาครึ่งชีวิต พลังงานก่อกัมมันต์ และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทีนและสภาวะการเก็บที่สภาวะแตกต่างกัน (ต่อ)

Strain	Order	Temp. (°C)	Storage condition	Regression equation ($\ln CA = -kt + \ln CA_0$)	k	R ²	Half- life ($t_{1/2}$)		Ea (kJ mol ⁻¹)
							(weeks)	(years)	
Nang Sew	Second stage	4	Dark	$y = -0.0193x + 2.6766$	0.0193	0.9315	35.91	0.75	7.251
	first order	-20	Dark	$y = -0.0041x + 2.6151$	0.0041	0.9905	169.06	3.52	
		-80	Dark	$y = -0.0033x + 2.6702$	0.0033	0.7445	210.04	4.38	
	First order	40	Dark	$y = -2.5641x + 2.9952$	2.5641	0.9335	0.27	0.01	-
		25	Dark	$y = -0.6387x + 3.5071$	0.6387	0.9891	1.09	0.02	
		25	Light	$y = -0.9179x + 4.137$	0.9179	0.8596	0.76	0.02	
Nang Lai	First stage	4	Dark	$y = -0.415x + 3.2564$	0.4150	0.8266	1.67	-	0.450
	first order	-20	Dark	$y = -0.4054x + 3.2518$	0.4054	0.8074	1.71	-	
		-80	Dark	$y = -0.3806x + 3.2524$	0.3806	0.7889	1.82	-	
	Second stage	4	Dark	$y = -0.0067x + 2.5044$	0.0067	0.9613	103.45	2.16	5.620
	first order	-20	Dark	$y = -0.0039x + 2.547$	0.0039	0.988	177.73	3.70	
		-80	Dark	$y = -0.0021x + 2.5497$	0.0021	0.7377	330.07	6.88	
	First order	40	Dark	$y = -1.6397x + 2.8856$	1.6397	0.9687	0.42	0.01	-
		25	Dark	$y = -0.919x + 3.7024$	0.919	0.9729	0.75	0.02	
		25	Light	$y = -1.5707x + 3.491$	1.5707	0.9929	0.44	0.01	

ตารางที่ 4.2 เวลาครึ่งชีวิต พลังงานก่อกัมมันต์ และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทีนและสถานะการเก็บที่สถานะแตกต่างกัน (ต่อ)

Strain	Order	Temp. (°C)	Storage condition	Regression equation ($\ln CA = -kt + \ln CA_0$)	k	R ²	Half- life ($t_{1/2}$)		Ea (kJ mol ⁻¹)
							(weeks)	(years)	
Samrong	First stage	4	Dark	$y = -0.3842x + 3.2411$	0.3842	0.8106	1.80	-	0.642
	first order	-20	Dark	$y = -0.367x + 3.2423$	0.3670	0.7998	1.89	-	
		-80	Dark	$y = -0.3382x + 3.2552$	0.3382	0.8147	2.05	-	
	Second stage	4	Dark	$y = -0.0655x + 2.7313$	0.0655	0.9430	10.58	0.22	11.612
	first order	-20	Dark	$y = -0.0022x + 2.5571$	0.0022	0.9068	315.07	6.56	
		-80	Dark	$y = -0.0029x + 2.605$	0.0029	0.7645	239.02	4.98	
	First order	40	Dark	$y = -2.028x + 3.6454$	2.028	0.9395	0.34	0.01	-
		25	Dark	$y = -1.1909x + 3.0098$	1.1909	0.9116	0.58	0.01	
		25	Light	-	-	-	-	-	

4.2.3 การศึกษาผลของการเติมวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีน

ดังที่กล่าวมาแล้วในการศึกษาผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อความคงตัวของลูทีน (ข้อ 4.2.1) ว่าความร้อนและแสงสว่างเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ลูทีนเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้อายุการเก็บ ($t_{1/2}$) ต่ำสุดเหลือเพียง 0.48 สัปดาห์ หรือ 3.36 วัน และสูงสุด 8 ปีที่การเก็บรักษา -80 องศาเซลเซียส จากการศึกษาที่ผ่านมาของโดย Aimjongjun และคณะ (2013) พบว่าโพลีเอทิลีนซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีสามารถป้องกันการเสื่อมสลายของลูทีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) ได้หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าวิตามินซีในสารละลายต่างช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนจากสาหร่าย (Shi and Chen, 1997) ได้เช่นกัน แสดงว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้ จากการศึกษาผลของวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนด้วยการเปรียบเทียบปริมาณการลดลงกับตัวอย่างลูทีนที่ไม่ผสมวิตามินอี เลือกศึกษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เนื่องจากผลการศึกษาในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาลูทีน แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใช้พลังงานน้อยและประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าเมื่อนำไปใช้ในทางการค้า และหากวิตามินอีสามารถช่วยชะลอการสลายตัวของลูทีนได้ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องจะช่วยประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่ายได้มากยิ่งขึ้น

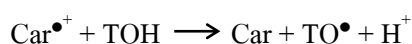
จากการศึกษาผลของวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสพบว่า วิตามินอีช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ เนื่องจากตัวอย่างลูทีนที่ผสมวิตามินอีจะมีค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) (ตารางที่ 4.3) โดยปริมาณที่คงอยู่ของลูทีนทางการค้าที่ผสมวิตามินอีเมื่อเก็บรักษาครบ 48 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมีค่ามากกว่าลูทีนที่ไม่ผสมวิตามินอีร้อยละ 57.2 และ 71.7 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยที่มีปริมาณลูทีนที่คงอยู่ในตัวอย่างที่ผสมวิตามินอีมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอีคิดเป็นร้อยละ 46.4 และ 77.6 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางคู่คิดเป็นร้อยละ 32.4 และ 39.9 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางสีวคิดเป็นร้อยละ 30.3 และ 51.0 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางลายคิดเป็นร้อยละ 30.0 และ 14.1 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์สำโรงคิดเป็นร้อยละ 24.9 และ 94.0 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสงสว่างและในที่มืด พบว่าวิตามินอีมีผลต่อค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนในทุกกลุ่มตัวอย่างที่เก็บภายใต้แสงสว่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นลูทีนจาก

รังไหมเหลือผงพันธุ์นางสาว ถึงแม้ว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนจะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติแต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณลูทีนที่คงอยู่ของตัวอย่างที่ผสมวิตามินอีและไม่ผสมวิตามินอีที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 4 7 และ 19 สัปดาห์ พบว่าลูทีนจากรังไหมเหลือผงพันธุ์นางสาวที่ผสมวิตามินอีที่เหลืออยู่มีค่ามากกว่าร้อยละ 84.8 98.4 97 และ 100 ตามลำดับ ส่วนผลของวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนที่อุณหภูมิห้องในที่มืดพบว่า วิตามินอีมีผลต่อค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนจากรังไหมสายพันธุ์นางสาว และสำโรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติในตัวอย่างอีก 3 สายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของการคงอยู่ (%retention) ของลูทีนพบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บ 19 สัปดาห์ ตัวอย่างลูทีนทางการค้าที่ผสมวิตามินอีที่เหลืออยู่ (11.2%) มีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอีที่เหลือเพียงร้อยละ 4.1 เช่นเดียวกับตัวอย่างลูทีนจากรังไหมเหลือผงพันธุ์นางสาวคู่ที่ผสมวิตามินอีมีร้อยละของการคงอยู่ของลูทีนเท่ากับร้อยละ 10.16 ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอีมีค่าเพียงร้อยละ 0.34 ส่วนลูทีนจากรังไหมเหลือผงพันธุ์นางสาวและนางสาวที่ผสมวิตามินอีที่มีร้อยละของการคงอยู่ของลูทีนเท่ากับ 9.4 และ 9.1 ตามลำดับ แต่ตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอีของ 2 สายพันธุ์ดังกล่าว ลูทีนมีการสลายตัวหมดไปตั้งแต่ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 7 สัปดาห์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า วิตามินอีมีผลชะลอการเสื่อมสลายของลูทีน ซึ่งสภาวะการเก็บที่ดีที่สุดของลูทีนทางการค้า และลูทีนจากรังไหมเหลือทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ -20 องศาเซลเซียสในที่มืดภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนและผสมวิตามินอีปริมาณ 5 เท่าของปริมาณลูทีน

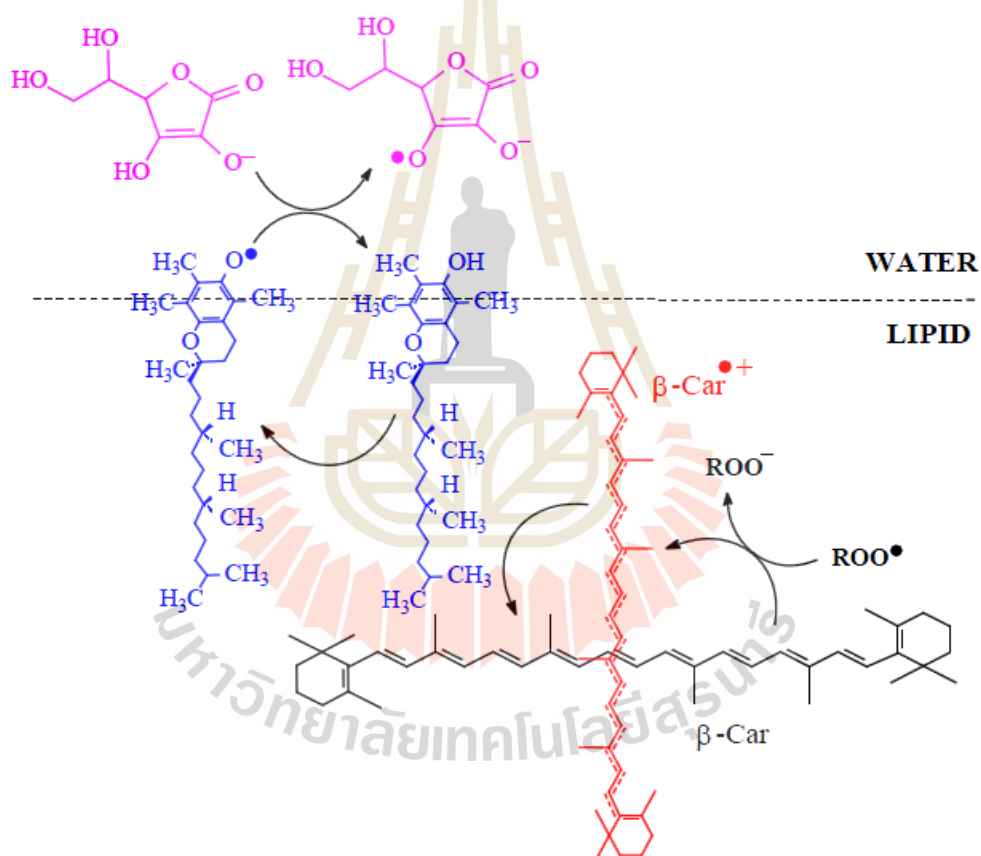
จากการศึกษาผลของวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนเบื้องต้นพบว่า การผสมวิตามินอีในตัวอย่างลูทีนปริมาณ 5 เท่าของปริมาณลูทีน สามารถชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจนำไปใช้ได้จริงในทางอุตสาหกรรมและการค้า ดังนั้นการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของวิตามินอีที่ใช้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยการศึกษาปริมาณของวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนใช้วิตามินอี 3 ระดับ คือ 1 2 และ 4 เท่าของปริมาณลูทีน เลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองเบื้องต้น คือ -20 องศาเซลเซียสในที่มืด ตัวอย่างลูทีนที่ใช้คือ ลูทีนทางการค้า ลูทีนจากรังไหมเหลือผงพันธุ์นางสาวเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงมากที่สุด และพันธุ์สำโรงซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีลูทีนเป็นองค์ประกอบมากที่สุด (ข้อ 4.1) และใช้ระยะเวลาในการศึกษา 4 สัปดาห์ เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ลูทีนมีการสลายตัวมากที่สุด จากการศึกษาพบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บในสัปดาห์แรกค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนทางการค้าที่คงอยู่เมื่อผสมวิตามินอี 1 และ 2 เท่าของปริมาณลูทีนมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เดียวกันการผสมวิตามินอี 2 และ 4 เท่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน แต่ที่การผสมวิตามินอีปริมาณ 1 และ 4 เท่า มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้จะความแตกต่างทางสถิติแต่ค่าดังกล่าวต่างกันเพียงร้อยละ 1.8 และเมื่อเก็บรักษาจนครบ 4 สัปดาห์ พบว่า การผสมวิตามินอีในทุกระดับการทดลองทำให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนที่คงอยู่มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนตัวอย่างจากรังไหมเหลือผงพันธุ์

นางน้อยและสำโรงพบว่า พันธุ์นางน้อยที่ผสมวิตามินอีปริมาณ 4 เท่าของปริมาณลูทีนมีค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนที่คงอยู่มากที่สุด รองลงมาคือการผสมวิตามินอีในปริมาณ 1 และ 2 เท่าที่มีค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนที่คงอยู่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวเหมือนกันในทุกสัปดาห์ของการเก็บรักษา แม้ว่าการผสมวิตามินอี 4 เท่าจะทำให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนที่คงอยู่มีความแตกต่างทางสถิติกับการผสมวิตามินอี 1 และ 2 เท่า แต่ค่าดังกล่าวต่างกับการผสมวิตามินอี 4 เท่า เพียงร้อยละ 4.6 และ 4.5 ตามลำดับที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของปริมาณลูทีนที่คงอยู่ของลูทีนจากโรงไหมเหลืองพันธุ์สำโรงที่ผสมวิตามินอี 1 2 และ 4 เท่า มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกสัปดาห์ของการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.4) แนวโน้มการเสื่อมสลายของลูทีนจากการใช้ปริมาณวิตามินอีทั้ง 3 ระดับในตัวอย่างลูทีนทางการค้า และลูทีนจากโรงไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย และสำโรง สอดคล้องกับการศึกษาในเบื้องต้นที่ใช้วิตามินอีปริมาณ 5 เท่า คือ ลูทีนมีการเสื่อมสลายในช่วงสัปดาห์แรกอย่างรวดเร็ว และมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 2-4 และปริมาณของวิตามินอีที่ต่างกัน ช่วยชะลอการเสื่อมสภาพของลูทีนจากโรงไหมเหลืองตลอดการเก็บรักษานาน 4 สัปดาห์ได้ไม่แตกต่างกันนอกจากนี้ยังมีร้อยละของการคงอยู่ของลูทีนใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ผสมวิตามินอี 5 เท่า โดยลูทีนจากโรงไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยที่ผสมกับวิตามินอี 1 2 4 และ 5 เท่ามีร้อยละของการคงอยู่ของลูทีนเท่ากับ 53.71 53.75 56.19 และ 55.27 ตามลำดับ เช่นเดียวกับพันธุ์สำโรงที่มีร้อยละของการคงอยู่ของลูทีนเท่ากับ 56.89 57.19 57.01 และ 57.95 เมื่อผสมวิตามินอี 1 2 4 และ 5 เท่าของปริมาณลูทีนตามลำดับ ในขณะที่ลูทีนทางการค้ามีร้อยละของการคงอยู่ของลูทีนเท่ากับ 33.20 34.07 34.24 และ 37.24 ตามลำดับ ดังนั้นในการนำไปใช้ทางอุตสาหกรรมและการค้า การเลือกใช้วิตามินอีที่ระดับต่ำที่สุด (1 เท่า) จึงเหมาะสมสำหรับสารสกัดลูทีนจากโรงไหมเหลือง แต่สำหรับลูทีนทางการค้าการเลือกใช้วิตามินอีที่ระดับ 5 เท่าช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้มากกว่า แต่ร้อยละของการคงอยู่ของลูทีนต่างจากการใช้วิตามินอีที่ระดับ 1 เท่า เพียงร้อยละ 4.04

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเสื่อมสลายของลูทีนคืออนุมูลอิสระ ดังนั้นวิตามินอี และวิตามินซีซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแคโรทีนอยด์และวิตามินอีรวมทั้งวิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์เสริมกัน (Burke, Edge, Land, and Truscott, 2001; Edge, Land, McGarvey, Mulroy, and Truscott, 1998; El-Agamey, Cantrell, Land, McGarvey, and Truscott, 2004; Mortensen and Skibsted, 1997) โดยวิตามินอี (tocopherol, TOH) อาจทำให้อนุมูลเบต้าแคโรทีนลดลง และสามารถฟื้นฟู (regenerate) แคโรทีนอยด์ได้ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Han et al., 2012)



นอกจากนี้ Han และคณะ ยังเสนอกลไกการออกฤทธิ์แบบเสริมกันของการต้านอนุมูลอิสระระหว่างแคโรทีนอยด์ วิตามินอี และวิตามินซี ดังภาพที่ 4.12 ซึ่งเมื่อเบต้าแคโรทีนทำปฏิกิริยากับอนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์แล้ว จะอยู่ในรูปอนุมูลเบต้าแคโรทีนที่มีประจุบวก หลังจากนั้นจะถูกฟื้นฟูให้อยู่ในรูปของเบต้าแคโรทีนโดยวิตามินอี เช่นเดียวกับวิตามินอีที่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ ภายหลังจากการให้อิเล็กตรอนกับเบต้าแคโรทีนแล้ว จะถูกฟื้นฟูให้มีประสิทธิภาพเช่นเดิมด้วยวิตามินซีเช่นกัน ฉะนั้นในการศึกษาผลของการวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนอาจกล่าวได้ว่า วิตามินอีช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้ด้วยการเสริมฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยฟื้นฟูอนุมูลลูทีนให้กลับมามีประสิทธิภาพเช่นเดิม



ภาพที่ 4.12 กลไกการต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์เสริมกันของแคโรทีนอยด์ วิตามินอี และวิตามินซี
ที่มา: Han, Zhang, and Skibsted, 2012

ตารางที่ 4.3 ผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดจากรังไหมเหลืองและลูทีนทางการค้าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Strain	Time (Weeks)	Lutein concentration (ppm)							
		-20°C (Dark)		4°C (Dark)		25°C (Dark)		25°C (Light)	
		Plus vitamin E ^{**}	Not vitamin E	with vitamin E ^{**}	Not vitamin E	Plus vitamin E ^{ns}	Not vitamin E	Plus vitamin E ^{**}	Not vitamin E
Commercial lutein	0	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964
	1	11.233±0.785	7.977±0.330	11.810±0.047	3.270±0.184	24.253±2.026	10.231±1.032	11.676±1.024	5.231±0.772
	2	10.773±0.724	7.681±0.446	11.638±0.168	3.163±0.434	7.784±0.398	6.907±0.903	6.597±1.140	3.390±0.033
	4	10.607±0.646	7.595±0.065	11.515±1.258	3.121±0.197	4.624±0.557	3.849±3.451	1.966±0.283	1.005±0.090
	7	10.547±0.426	6.728±1.252	10.417±0.050	2.880±0.050	3.392±1.772	1.522±0.387	1.179±0.080	0.000±0.000
	19	9.999±0.684	5.328±1.528	9.283±0.479	2.650±0.437	3.222±0.354	1.176±0.057	0.051±0.088	0.000±0.000
	48	9.873±1.236	4.222±1.093	7.926±0.462	2.245±0.178	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Nang Noi	0	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666
	1	16.093±0.263	12.747±0.392	27.769±0.846	13.098±0.732	24.205±1.288	12.093±2.016	14.253±1.934	6.398±0.581
	2	15.843±0.394	11.284±1.555	13.932±0.315	11.360±0.711	10.353±0.104	0.975±0.235	10.323±0.792	0.238±0.263
	4	15.394±0.206	11.119±1.396	13.208±0.191	11.318±0.328	7.437±0.057	0.265±0.231	4.960±1.639	0.000±0.000
	7	15.226±0.732	10.420±1.296	12.926±0.242	9.997±1.024	3.287±0.060	0.000±0.000	2.620±0.112	0.000±0.000
	19	14.846±0.135	9.813±0.175	12.740±0.241	9.150±0.061	2.608±0.081	0.000±0.000	1.612±0.256	0.000±0.000
	48	14.691±0.303	7.871±0.764	10.123±0.133	2.263±0.278	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Nang Tui	0	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491
	1	19.045±0.028	14.368±0.093	17.621±0.146	16.261±0.927	30.278±1.152	22.086±1.382	15.975±1.885	12.156±3.603
	2	17.842±0.550	13.085±0.609	17.117±1.665	14.664±0.041	13.891±0.062	9.138±0.147	12.025±1.517	2.354±2.109
	4	17.815±0.548	13.454±0.564	17.247±0.224	13.798±0.377	9.435±0.127	3.681±1.046	6.855±0.749	0.343±0.298
	7	17.733±0.016	12.905±0.963	16.169±0.120	13.625±0.030	4.541±0.234	0.332±0.222	3.417±0.253	0.000±0.000

ตารางที่ 4.3 ผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดจากรังไหมเหลืองและลูทีนทางการค้าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)

Strain	Time (Weeks)	Lutein concentration (ppm)							
		-20°C (Dark)		4°C (Dark)		25°C (Dark)		25°C (Light)	
		Plus vitamin E ^{**}	Not vitamin E	with vitamin E ^{**}	Not vitamin E	Plus vitamin E ^{ns}	Not vitamin E	Plus vitamin E ^{**}	Not vitamin E
Nang Tui	19	17.467±1.353	12.202±0.312	15.720±0.510	12.537±0.034	3.416±0.179	0.113±0.195	1.938±0.034	0.000±0.000
	48	17.148±0.260	11.598±0.564	13.715±0.173	8.249±0.266	0.078±0.134	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Nang Sew	0	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728
	1	17.439±0.291	14.333±0.465	29.410±1.746	13.289±0.513	27.618±2.413	19.049±0.230	14.649±1.528	15.317±1.252
	2	16.947±0.335	13.679±1.612	16.437±0.641	13.053±0.364	12.685±0.782	10.437±2.064	10.391±0.119	1.581±1.616
	4	16.906±0.193	13.543±1.340	15.154±0.080	12.701±0.628	8.929±0.218	2.399±0.340	6.600±1.728	0.106±0.092
	7	16.687±0.255	13.143±0.271	14.830±0.141	12.079±0.374	3.982±0.453	0.000±0.000	2.571±0.188	0.076±0.132
	19	16.287±1.287	12.717±1.898	14.634±0.297	11.787±1.603	2.707±0.270	0.000±0.000	1.496±0.044	0.000±0.000
	48	16.129±0.138	11.242±1.738	11.142±0.299	5.463±0.092	0.203±0.025	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
Nang Lai	0	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395
	1	15.636±0.943	13.705±0.355	28.254±0.257	13.762±0.496	23.977±0.502	17.022±0.371	14.662±1.914	9.143±1.107
	2	15.631±0.232	12.875±0.235	15.054±0.111	12.631±0.015	10.320±0.011	6.490±0.870	11.447±2.044	1.118±0.932
	4	15.457±0.935	12.587±1.328	14.380±0.008	12.305±1.091	7.493±0.344	2.012±1.114	7.003±0.440	0.064±0.111
	7	15.406±0.612	12.312±0.568	13.761±0.204	11.286±0.161	3.614±0.468	0.044±0.076	2.623±0.195	0.000±0.000
	19	15.180±0.465	11.994±0.457	13.107±0.122	10.749±0.844	2.370±0.055	0.000±0.000	2.363±0.076	0.000±0.000
	48	15.100±0.162	10.563±0.521	10.341±0.391	8.882±1.037	0.206±0.063	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

ตารางที่ 4.3 ผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดจากรังไหมเหลืองและลูทีนทางการค้าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)

Strain	Time (Weeks)	Lutein concentration (ppm)							
		-20°C (Dark)		4°C (Dark)		25°C (Dark)		25°C (Light)	
		Plus vitamin E ^{**}	Not vitamin E	with vitamin E ^{**}	Not vitamin E	Plus vitamin E ^{ns}	Not vitamin E	Plus vitamin E ^{**}	Not vitamin E
Samrong	0	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404
	1	16.869±0.502	14.343±1.007	15.300±1.125	14.049±0.606	28.276±0.832	7.331±2.826	13.660±1.088	1.010±0.236
	2	16.587±0.464	13.658±0.655	14.572±0.246	13.197±0.560	11.140±1.301	0.734±0.133	11.809±1.809	0.000±0.000
	4	16.490±0.165	12.763±0.363	14.589±0.404	12.770±0.758	8.296±0.213	0.265±0.230	6.478±0.235	0.000±0.000
	7	15.839±0.344	12.893±0.308	12.792±0.278	6.729±1.357	3.284±0.151	0.000±0.000	2.350±0.213	0.000±0.000
	19	15.711±0.180	12.142±1.038	12.647±0.338	6.603±0.561	2.310±0.166	0.000±0.000	1.980±0.278	0.000±0.000
	48	15.525±0.870	11.667±1.351	9.956±0.245	0.593±0.057	0.166±0.009	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

หมายเหตุ: ^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับลูทีนที่ไม่ผสมวิตามินอีที่อุณหภูมิเดียวกัน ($p>0.05$)

^{**} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลูทีนที่ไม่ผสมวิตามินอีที่อุณหภูมิเดียวกัน ($p<0.01$)



ตารางที่ 4.4 ผลของปริมาณวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Sample	Time (Week)	Lutein concentration (ppm)			Retention of lutein (%)		
		1 time	2 times	4 times	1 time	2 times	4 times
Commercial lutein	0	32.000	32.000	32.000	100.00	100.00	100.00
	1	11.063 ^b	11.153 ^{ab}	11.263 ^a	34.573	34.852	35.198
	2	10.895 ^b	11.058 ^{ab}	11.063 ^a	34.045	34.556	34.573
	3	10.828 ^a	11.038 ^a	11.056 ^a	33.837	34.495	34.550
	4	10.624 ^a	10.902 ^a	10.958 ^a	33.199	34.069	34.242
Silk lutein (Nangnoi)	0	32.000	32.000	32.000	100.00	100.00	100.00
	1	17.475 ^b	17.631 ^b	18.197 ^a	54.610	55.097	56.864
	2	17.433 ^b	17.425 ^b	18.235 ^a	54.479	54.452	56.984
	3	17.296 ^b	17.169 ^b	18.149 ^a	54.049	53.653	56.714
	4	17.188 ^b	17.201 ^b	17.981 ^a	53.713	53.752	56.189
Silk lutein (Samrong)	0	32.000	32.000	32.000	100.00	100.00	100.00
	1	18.628 ^a	18.703 ^a	18.734 ^a	58.213	58.448	58.542
	2	18.363 ^a	18.500 ^a	18.618 ^a	57.384	57.813	58.180
	3	18.354 ^a	18.412 ^a	18.589 ^a	57.355	57.538	58.091
	4	18.204 ^a	18.301 ^a	18.243 ^a	56.887	57.189	57.010

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษาผลของวิตามินอีต่อความคงตัวของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ในช่วงระยะเวลา 48 สัปดาห์ พบว่าการลดลงของปริมาณลูทีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสงสว่างสอดคล้องกับปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของลูทีนที่เปลี่ยนแปลงไปกับระยะเวลาการเก็บเป็นแบบเส้นตรง (ตารางที่ 4.6) สอดคล้องกับการศึกษาของตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอีในข้อ 4.2.2 และจากการทำนายอายุการเก็บของสารสกัดลูทีนจากค่าครึ่งชีวิต พบว่า ลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีค่าครึ่งชีวิตมากกว่าตัวอย่างลูทีนที่ไม่ผสมวิตามินอี ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องการลดลงของปริมาณลูทีนจากรังไหมเหลืองสอดคล้องกับปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง เช่นเดียวกับการศึกษาในตัวอย่างที่

ไม่ผสมวิตามินอี ในขณะที่การเสื่อมสลายของลูทีนทางการค้ามีลักษณะเป็น two-stage first-order kinetic นอกจากนี้การเสื่อมสลายของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรงไหมเหลืองที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียสมีลักษณะเป็น two-stage first-order kinetic ด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับการศึกษาในตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอี คือในช่วง 2 สัปดาห์แรกลูทีนมีการเสื่อมสลายอย่างรวดเร็ว และหลังจากนั้นปริมาณลูทีนมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อยจนครบ 48 สัปดาห์ จากการศึกษาความคงตัวเชิงจลนศาสตร์ของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรงไหมเหลืองพบว่า ในช่วงแรกของการเก็บรักษาค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนจะมีค่ามากกว่าการเก็บรักษาในช่วงสัปดาห์ที่ 3-48 แม้ว่าการเสื่อมสลายของลูทีนในตัวอย่างที่ผสมและไม่ผสมวิตามินอีจะมีรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายพบว่า ค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของตัวอย่างที่ผสมวิตามินอีมีค่าน้อยกว่า ซึ่งการเปลี่ยนแปลงช่วงแรก (first state) ค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนทางการค้าที่ไม่ผสมวิตามินอีมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ผสมวิตามินอีปริมาณ 5 เท่าของปริมาณลูทีน 2.4 และ 1.3 เท่าที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เช่นเดียวกับลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยที่มีค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอีที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส มากกว่า 1.3 และ 1.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผสมวิตามินอีปริมาณ 5 เท่าของปริมาณลูทีน ตามลำดับ พันธุ์นางน้อยมีค่ามากกว่า 1.2 และ 1.5 ตามลำดับ พันธุ์นางสาวมีค่ามากกว่า 1.4 เท่าทั้งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส ส่วนพันธุ์นางลายที่ไม่ผสมวิตามินอีมีค่ามากกว่า 1.3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผสมวิตามินอี ทั้งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส และพันธุ์สำโรงที่ไม่ผสมวิตามินอีมีค่ามากกว่า 1.1 และ 1.4 เท่า ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่สอง (second state) ที่พบว่า ค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของตัวอย่างลูทีนที่ผสมวิตามินอีทั้งหมดมีค่าน้อยกว่าตัวอย่างลูทีนที่ไม่ผสมวิตามินอี ยกเว้นลูทีนทางการค้าที่มีค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของตัวอย่างที่ผสมวิตามินอี (0.0077) มากกว่าลูทีนทางการค้าที่ไม่ผสมวิตามินอี (0.0069) และลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางลายมีค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของตัวอย่างที่ผสมวิตามินอี (0.0073) มากกว่าไม่ผสมวิตามินอี (0.0067) (ตารางที่ 4.6) แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างดังกล่าวมีค่าไม่มาก และการเปลี่ยนแปลงช่วงแรกค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสลายของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางลายที่ผสมวิตามินอีมีค่าน้อยกว่า ทำให้ปริมาณเริ่มต้นของลูทีนในการเปลี่ยนแปลงช่วงที่สองมีค่ามากกว่า ส่งผลให้เมื่อเก็บจนครบ 48 สัปดาห์ปริมาณลูทีนที่คงอยู่ในตัวอย่างที่ผสมวิตามินอีจึงมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ไม่ผสมวิตามินอี เมื่อทำนายค่าครึ่งชีวิตจากการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่สองพบว่า ลูทีนจากรงไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถเก็บได้นานกว่าลูทีนทางการค้า โดยค่าครึ่งชีวิตของลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศา

เซลเซียส มีค่าเท่ากับ 2.4 และ 14.4 ปี ตามลำดับ สายพันธุ์นางคู้ย 3.1 และ 18.1 ปี ตามลำดับ สายพันธุ์นางลิว 2.1 และ 14.4 ปี ตามลำดับ สายพันธุ์นางลาย 2 และ 28.8 ปี ตามลำดับ และพันธุ์สำโรง 1.9 และ 14.4 ปี ตามลำดับ ในขณะที่ลูทีนทางการค้ามีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 1.9 และ 9 ปี เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิตามินอีช่วยชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้ และสภาวะการเก็บรักษาลูทีนที่เหมาะสมที่สุดคือ เก็บรักษาโดยผสมวิตามินอีปริมาณต่ำสุด คือ 1 เท่าของปริมาณลูทีน อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากออกซิเจนและแสงสว่าง

แม้ว่าวิตามินอีจะสามารถช่วยชะลอการเสื่อมสภาพของลูทีนได้ทั้งการเปลี่ยนแปลงในช่วงแรก และช่วงที่สอง แต่จากข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA: 21 CFR 101.93(g)) ได้กำหนดให้ค่าต่ำสุดของสารธรรมชาติที่เป็นองค์ประกอบ หรือเติมเข้าไปเพื่อเป็นส่วนประกอบในอาหารเท่ากับร้อยละ 80 ของปริมาณเริ่มต้น เมื่อทำนายระยะเวลาที่ทำให้มีปริมาณลูทีนคงอยู่ร้อยละ 80 ของลูทีนทางการค้าที่ผสมวิตามินอี เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสพบว่า มีค่าเท่ากับ 0.5 สัปดาห์ ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย นางลิว และสำโรงที่ผสมวิตามินอีมีค่าเท่ากับ 0.8 สัปดาห์ ส่วนพันธุ์นางคู้ยและนางลายมีค่าเท่ากับ 0.7 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าที่ระยะเวลาดังกล่าวอยู่ในช่วงของการเปลี่ยนแปลงในช่วงแรกที่มีการเสื่อมสลายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในทางการค้าปริมาณของลูทีนเริ่มต้นที่ใช้ต้องมากเกินระดับความต้องการลูทีนในแต่ละวัน เพื่อรองรับการเสื่อมสลายในช่วงแรก ซึ่งหากผ่านการเปลี่ยนแปลงในช่วงแรก และเข้าสู่การเปลี่ยนแปลงในช่วงที่สองโดยที่ปริมาณลูทีนยังอยู่ในระดับความต้องการในแต่ละวันซึ่งผลิตภัณฑ์ลูทีนดังกล่าวจะสามารถเก็บได้นานยิ่งขึ้น

จากการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ลูทีนตามท้องตลาดใน โครงการการพัฒนาอาหารที่เป็นยาและผลิตภัณฑ์จากลูทีนที่สกัดได้จากรังไหมเหลืองและอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนชิริซิน (ได้รับการสนับสนุนทุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)) โดยการสุ่มตรวจตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูทีนตามท้องตลาดจำนวน 3 ยี่ห้อ จากตารางที่ 4.5 พบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวหมดอายุเร็วกว่ากำหนดมาก แม้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิตามที่ระบุไว้ข้างฉลากแล้วก็ตาม ฉะนั้นองค์ความรู้ทางด้านจลนศาสตร์นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้ ทำให้ลดปัญหาการเสื่อมสลายของลูทีนระหว่างการเก็บรักษา และสารผสมสภาพก่อนเวลากำหนดที่ข้างฉลาก ที่มีผลทั้งต่อผู้บริโภคโดยตรง และมีความผิดทางกฎหมายการหลอกลวงผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ลูทีนจากรังไหมเหลืองซึ่งมีความคงตัวมากกว่าลูทีนทางการค้าอาจเป็นตัวเลือกที่ช่วยลดการเข้ลูทีนจากต่างประเทศได้ในอนาคต

ตารางที่ 4.5 ความคงตัวของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูทีนตามห้องตลาด

รายละเอียด	ผลิตภัณฑ์ที่ 1	ผลิตภัณฑ์ที่ 2	ผลิตภัณฑ์ที่ 3
วันที่ผลิต	04/2009	22/12/2009	7/2007
วันหมดอายุ	03/2011	22/12/2011	12/2012
การเก็บรักษา (°C)	4	4	4
ปริมาณลูทีนที่ระบุข้างฉลาก (mg/tab)	4	6	6
วันที่เปิด	11/08/2010	24/06/2010	9/2010
วันที่วิเคราะห์	16/02/2011	16/02/2011	16/02/2011
ปริมาณลูทีนจากการวิเคราะห์ (mg/tab)	0.78±0.04	0	2.0±0.16

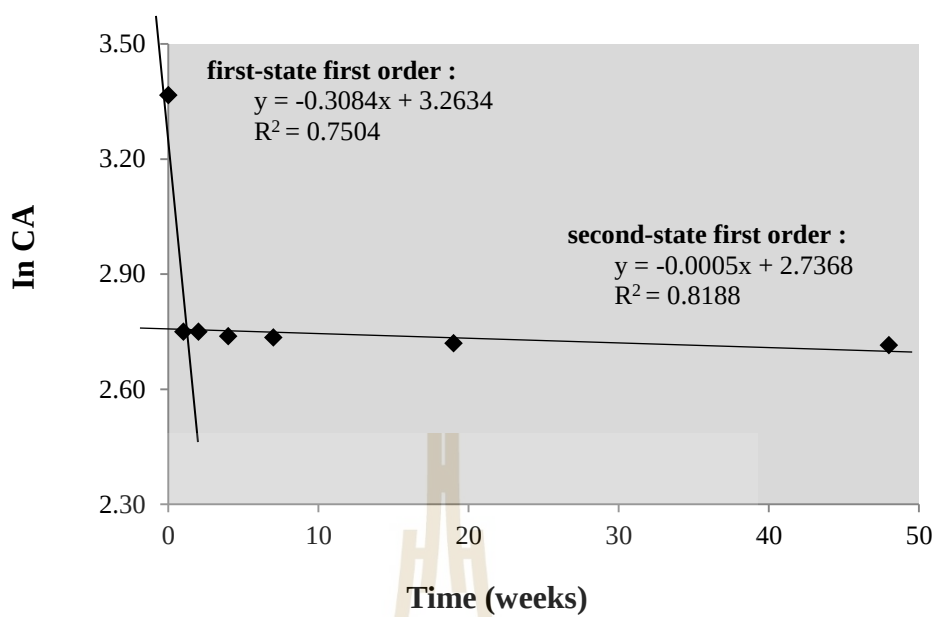
ที่มา: คัดแปลงจากโครงการการพัฒนาอาหารที่เป็นยาและผลิตภัณฑ์ยาจากลูทีนที่สกัดได้จาก
รังไหมเหลือและอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนชีรีซิน

ตัวอย่างการคำนวณ :

ดังที่มีการรายงานว่า การลดความเสี่ยงของโรคอประสาทตาเสื่อมร้อยละ 57 จำเป็นต้อง
บริโภคลูทีน 6 มิลลิกรัมต่อวัน (Alves-Rodrigues and Shao, 2004) ฉะนั้นในทางการค้าหากใช้สาร
สกัดลูทีนจากรังไหมเหลือผงพื้นฐานซึ่งจากการศึกษาพบว่า ในตัวอย่างที่ผสมวิตามินอีปริมาณ
5 เท่าของปริมาณลูทีน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในที่มืด และปราศจากออกซิเจน
มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 2.25 สัปดาห์ หรือประมาณ 16 วัน แสดงว่าปริมาณลูทีนจะลดลงร้อยละ 50 เมื่อ
เก็บรักษานาน 16 วัน ดังนั้นถ้าผลิตภัณฑ์มีปริมาณลูทีนเริ่มต้นเท่ากับ 15 มิลลิกรัมเมื่อเก็บรักษานาน
16 วัน จะมีปริมาณลูทีนที่เหลืออยู่ = $15 \times (50/100)$
= 7.5 มิลลิกรัม

และเมื่อเข้าสู่การเปลี่ยนแปลงในช่วงที่สองซึ่งการเสื่อมสลายของลูทีนค่อนข้างคงที่ ($k = 0.0005$)
(ภาพที่ 4.13) ตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ผลิตภัณฑ์
จะหมดอายุเมื่อสารสำคัญมีปริมาณต่ำกว่าร้อยละ 80 ดังนั้น ปริมาณลูทีนที่เหลืออยู่ (80% ของความ
เข้มข้นเริ่มต้นในการเปลี่ยนแปลงช่วงที่ 2) = $7.5 \times (80/100) = 6$ มิลลิกรัม

$$\begin{aligned} \text{สามารถเก็บได้นาน } (2.303/k)(\log [A]_0/[A]) &= (2.303/0.0005)(\log 7.5/6) \\ &= 446 \text{ สัปดาห์} \end{aligned}$$



ภาพที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางลายที่ผสมวิตามินอี 5 เท่า เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในที่มีดและปราศจากออกซิเจน

ตารางที่ 4.6 เวลาครึ่งชีวิต และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทีนผสมวิตามินอีและสภาวะการเก็บแตกต่างกัน

Strain	Order	Temp. (°C)	Storage condition	Regression equation ($\ln CA = -kt + \ln CA_0$)	k	R ²	Half- life ($t_{1/2}$)		Ea (kJ mol ⁻¹)
							(weeks)	(years)	
Commercial lutein	First stage	4	Dark	$y = -0.4506x + 3.2102$	0.4506	0.7622	1.54	-	3.659
	first order	-20	Dark	$y = -0.4892x + 3.2064$	0.4892	0.729	1.42	-	
		25	Dark	$y = -0.6517x + 3.5171$	0.6517	0.844	0.97	-	
	Second stage	4	Dark	$y = -0.0077x + 2.4211$	0.0077	0.9232	90.02	1.88	41.813
	first order	-20	Dark	$y = -0.0016x + 2.3587$	0.0016	0.780	433.22	9.03	
		25	Dark	$y = -0.0327x + 1.16192$	0.0327	0.954	22.80	0.48	
Nang Noi	First order	25	Light	$y = -0.3092x + 2.627$	0.3092	0.9508	2.24	0.05	-
	First stage	4	Dark	$y = -0.3464x + 3.4414$	0.3464	0.7533	2.00	-	-
	first order	-20	Dark	$y = -0.2821x + 3.2382$	0.2821	0.771	2.46	-	
	Second stage	4	Dark	$y = -0.006x + 2.6175$	0.006	0.950	115.52	2.41	-
	first order	-20	Dark	$y = -0.001x + 2.7295$	0.001	0.811	693.15	14.44	
	First order	25	Dark	$y = -0.1166x + 2.8092$	0.1166	0.699	5.94	0.12	
		25	Light	$y = -0.132x + 2.6195$	0.132	0.7512	5.25	0.11	

ตารางที่ 4.6 เวลาครึ่งชีวิต และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทีนผสมวิตามินอีและสภาวะการเก็บแตกต่างกัน (ต่อ)

Strain	Order	Temp.	Storage	Regression equation	k	R ²	Half- life (t _{1/2})		Ea
		(°C)	condition	(lnCA= -kt+lnCA ₀)			(weeks)	(years)	
Nang Tui	First stage	4	Dark	y = -0.3373x + 3.412	0.3373	0.782	2.05	-	-
	first order	-20	Dark	y = -0.3166x + 3.431	0.3166	0.826	2.19	-	-
	Second stage	4	Dark	y = -0.0047x + 2.8426	0.0047	0.954	147.48	3.07	-
	first order	-20	Dark	y = -0.0008x + 2.8809	0.0008	0.967	866.43	18.05	-
	First order	25	Dark	y = -0.1167x + 3.0628	0.1167	0.9508	5.94	0.12	-
		25	Light	y = -0.1307x + 2.8171	0.1307	0.781	5.30	0.11	-
Nang Sew	First stage	4	Dark	y = -0.2954x + 3.4858	0.2954	0.7614	2.35	-	-
	first order	-20	Dark	y = -0.2801x + 3.3065	0.2801	0.7882	2.47	-	-
	Second stage	4	Dark	y = -0.007x + 2.764	0.007	0.9416	99.02	2.06	-
	first order	-20	Dark	y = -0.001x + 2.822	0.001	0.7916	693.15	14.44	-
	First order	25	Dark	y = -0.0958x + 2.8543	0.0958	0.9237	7.24	0.15	-
		25	Light	y = -0.1399x + 2.7109	0.1399	0.7904	4.95	0.10	-

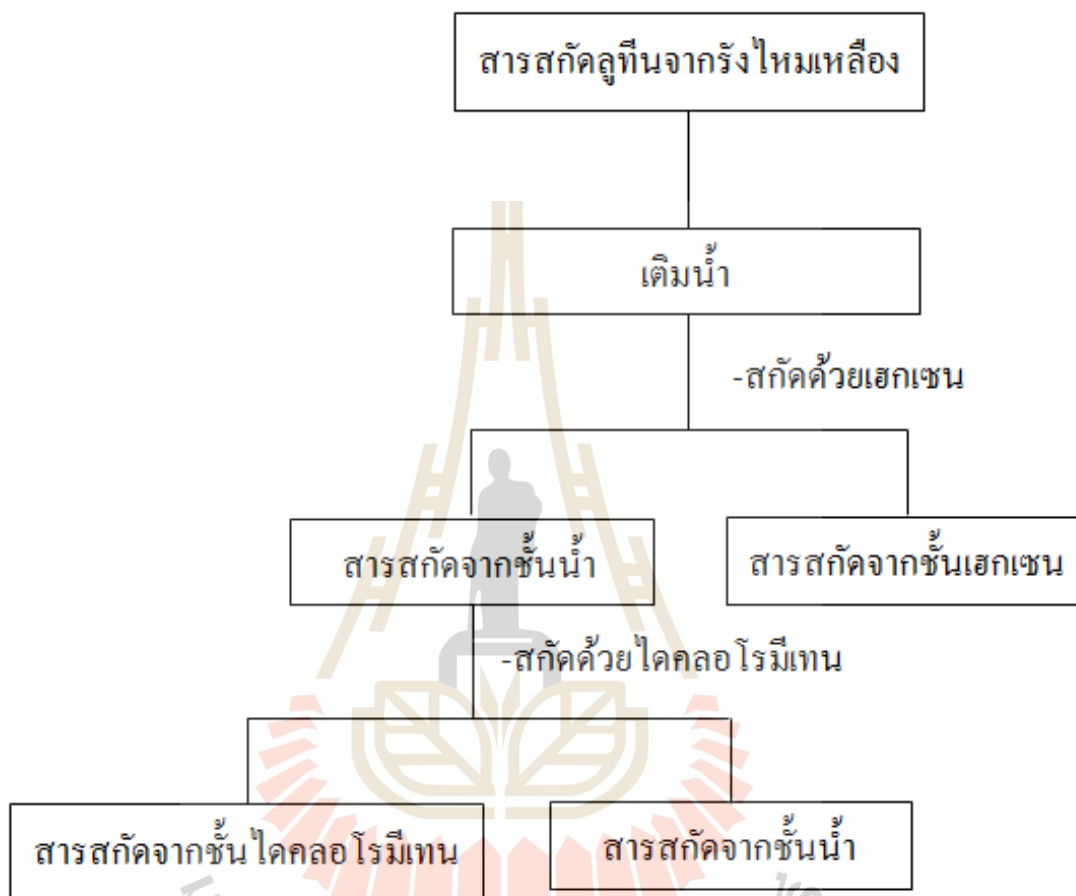
ตารางที่ 4.6 เวลาครึ่งชีวิต และสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูทีนผสมวิตามินอีและสภาวะการเก็บแตกต่างกัน (ต่อ)

Strain	Order	Temp. (°C)	Storage condition	Regression equation ($\ln CA = -kt + \ln CA_0$)	k	R ²	Half- life ($t_{1/2}$)		Ea (kJ mol ⁻¹)
							(weeks)	(years)	
Nang Lai	First stage	4	Dark	$y = -0.3272x + 3.4669$	0.3272	0.7785	2.12	-	-
	first order	-20	Dark	$y = -0.3084x + 3.2634$	0.3084	0.7504	2.25	-	-
	Second stage	4	Dark	$y = -0.0073x + 2.6912$	0.0073	0.9877	94.95	1.98	-
	first order	-20	Dark	$y = -0.0005x + 2.7368$	0.0005	0.8188	1386.29	28.88	-
	First order	25	Dark	$y = -0.093x + 2.7129$	0.093	0.9109	7.45	0.16	-
		25	Light	$y = -0.1162x + 2.6824$	0.0826	0.116	8.39	0.17	-
Samrong	First stage	4	Dark	$y = -0.3346x + 3.2531$	0.3346	0.8043	2.07	-	-
	first order	-20	Dark	$y = -0.2699x + 3.264$	0.2699	0.7734	2.57	-	-
	Second stage	4	Dark	$y = -0.0076x + 2.6642$	0.0076	0.9166	91.20	1.90	-
	first order	-20	Dark	$y = -0.001x + 2.7847$	0.0010	0.5718	693.15	14.44	-
	First order	25	Dark	$y = -0.0988x + 2.7795$	0.0988	0.9116	7.02	0.15	-
		25	Light	$y = -0.1247x + 2.659$	0.1247	0.709	5.56	0.12	-

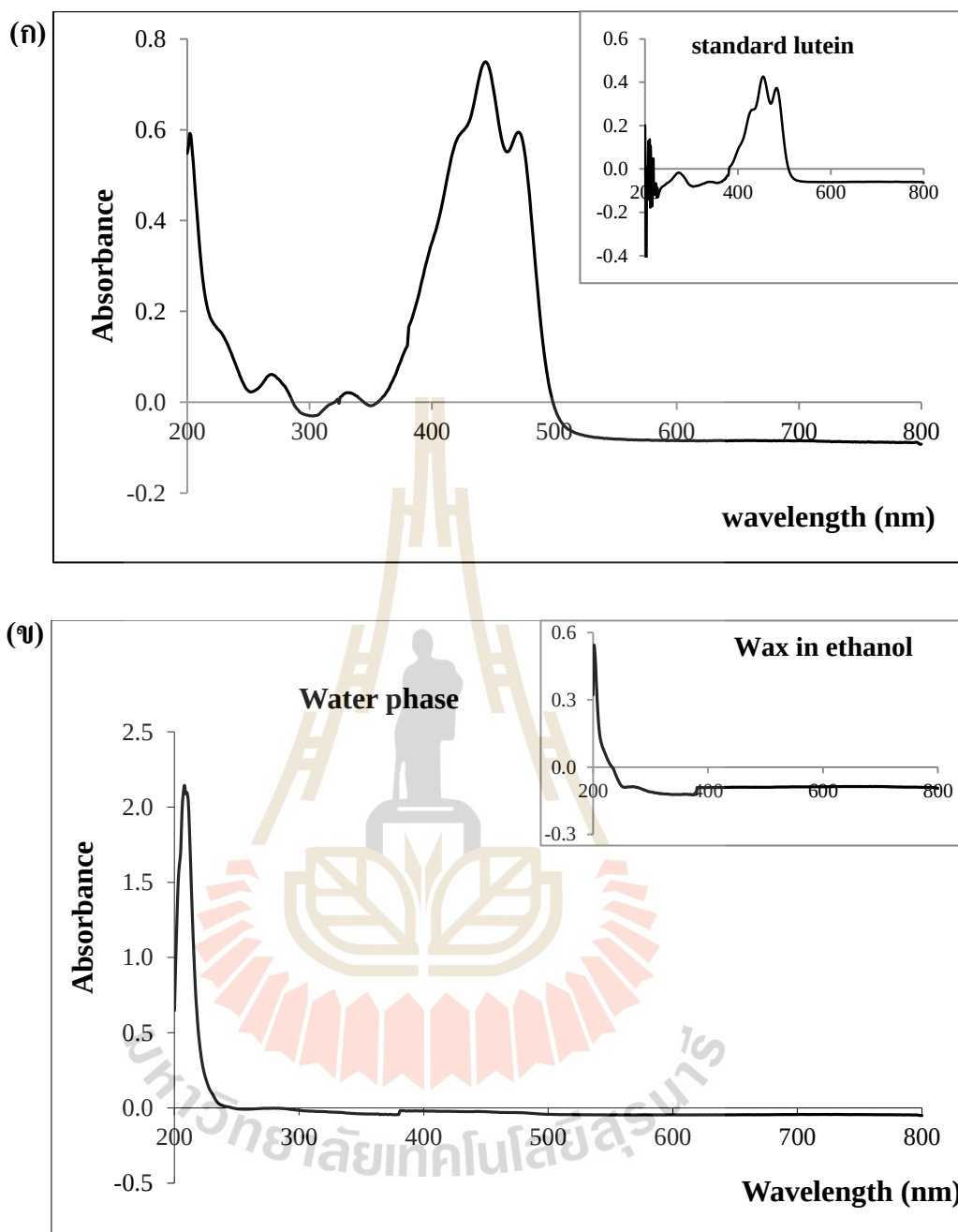
4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วน

เมื่อนำสารสกัดหยาบลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อยมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ดังผังงาน (flow chart) ในภาพที่ 4.14 จากนั้นตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-Vis spectroscopy พบว่าสารที่ถูกสกัดออกพร้อมกับน้ำคือส่วนของแว็กซ์ (wax) เนื่องจากมีสเปกตรัมเหมือนกับขี้ผึ้ง (bees wax) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยการสแกนความยาวคลื่น ผลจากสเปกตรัมที่ได้พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดของแว็กซ์จากเทียนไข และขี้ผึ้ง (bees wax) อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 200-230 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.15ข) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านของ Wang และคณะในปี 2005 ที่พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของแว็กซ์จากสนเข็ม (pine needle) มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 200-300 นาโนเมตร และมีรายงานว่านอกจากรังไหม (*Bombyx mori*) ประกอบด้วยไฟโบรอินและโปรตีนซีรีซินแล้วรังไหมยังมีคาร์โบไฮเดรต เกลือ แวกซ์ และฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ (Wang, Wang, Zhou, Zhu, and Zhang, 2012) ในส่วนของสารสกัดจากเฮกเซนมีทั้งส่วนของแว็กซ์ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 200-300 นาโนเมตร) และลูทีน เป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 4.15ค) ในขณะที่สารสกัดจากไดคลอโรมีเทนคาดว่าเป็นสารสกัดลูทีนเกือบหนึ่งร้อยเปอร์เซ็นต์เนื่องจากมีสเปกตรัมคล้ายกับสารมาตรฐานลูทีนดังภาพที่ 4.15ง และไม่ปรากฏฟีกในช่วงความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร ดังปรากฏในสเปกตรัมของสารสกัดหยาบลูทีน (ภาพที่ 4.15ก) สอดคล้องกับองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดยวิธี TLC พบว่า สารสกัดจากไดคลอโรมีเทนมีแถบสารปรากฏเพียงหนึ่งแถบและมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารใกล้เคียงกับสารมาตรฐานแซนโทฟิลล์ นอกจากนี้จากการศึกษาในโครงการการพัฒนาอาหารที่เป็นยาและผลิตภัณฑ์จากลูทีนที่สกัดได้จากรังไหมเหลืองและอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซีรีซิน (ได้รับการสนับสนุนทุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)) พบว่าในสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยยังประกอบด้วยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ร้อยละ 10.40 ของปริมาณไขมันทั้งหมด โดยมีกรดโอเลอิก (Oleic acid) กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid) กรดสเตียริก (Stearic acid) และกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid) เป็นองค์ประกอบหลัก และจากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือง 5 สายพันธุ์คือ นางน้อย นางลี้ นางคู่-นางลาย และสำโรง แล้วพบว่าลูทีนจากรังไหมเหลืองมีความคงตัวมากกว่าลูทีนทางการค้าที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจเนื่องมาจากส่วนประกอบอื่นในสารสกัดหยาบลูทีนจากรังไหมเหลือง และจากการแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดยวิธี TLC พบว่าลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีองค์ประกอบที่คล้ายกัน เพราะปรากฏแถบสารสีดำจำนวน 5 แถบบนแผ่น TLC และมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารใกล้เคียงกัน ดังนั้นลูทีนจากรังไหมเหลืองอีก 4 สายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีกรดไขมันอิสระและแว็กซ์เป็นส่วนประกอบเช่นกัน โดยแว็กซ์ที่เป็น

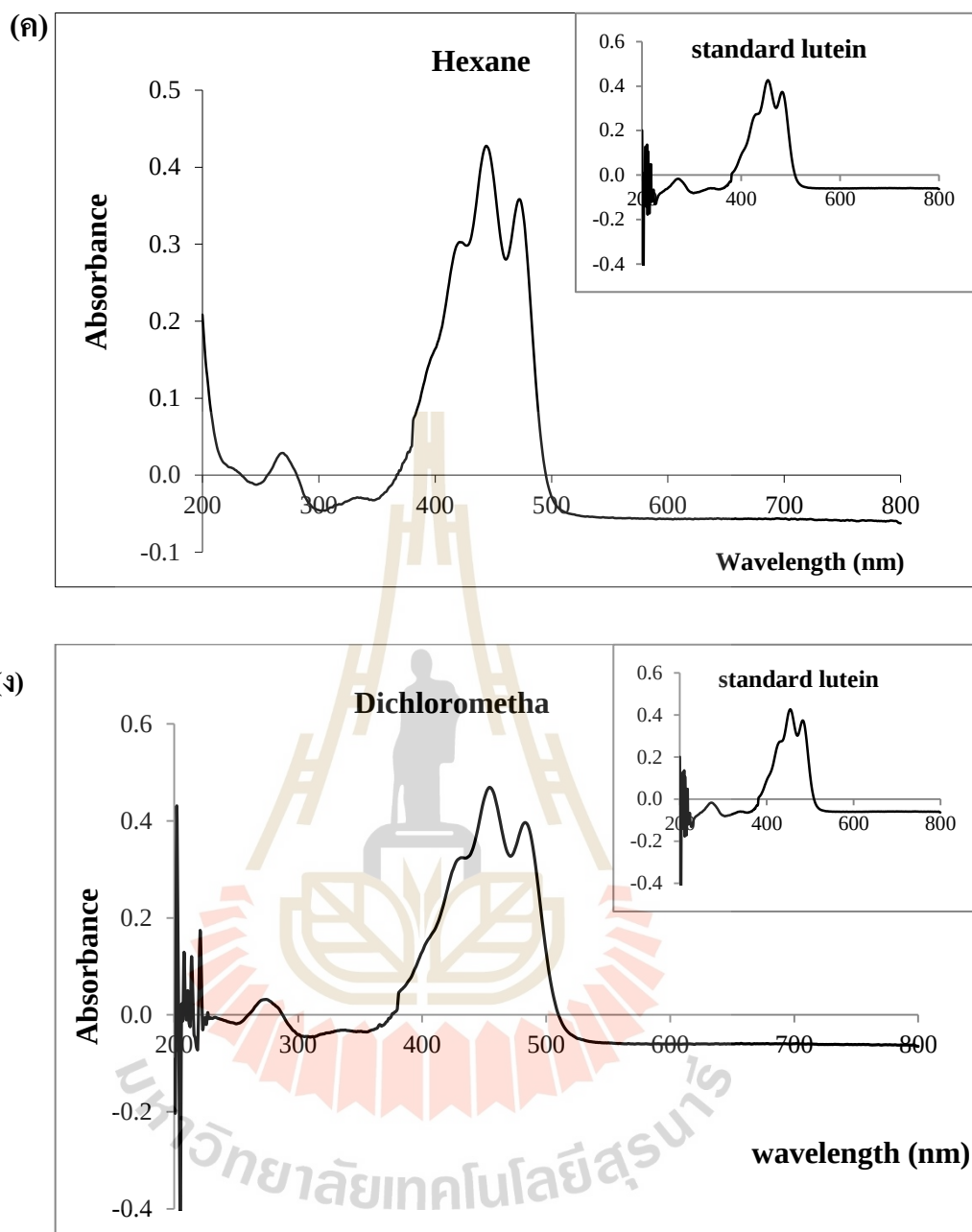
องค์ประกอบในสารสกัดจากขมิ้น จากขมิ้นเหลืองอาจช่วยลดการสัมผัสกับอากาศในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง (Aimjongjun et al., 2013) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ขมิ้นเหลืองมีความคงตัวมากกว่าขมิ้นทางการค้า



ภาพที่ 4.14 ฟังงานการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน



ภาพที่ 4.15 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบลูทีนจากรังไหมเหลือง (ก) และสารสกัดหยาบลูทีนที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนด้วยน้ำ (ข) เฮกเซน (ค) และไดคลอโรมีเทน (ง) จากการสแกนด้วยวิธี UV-Vis spectroscopy

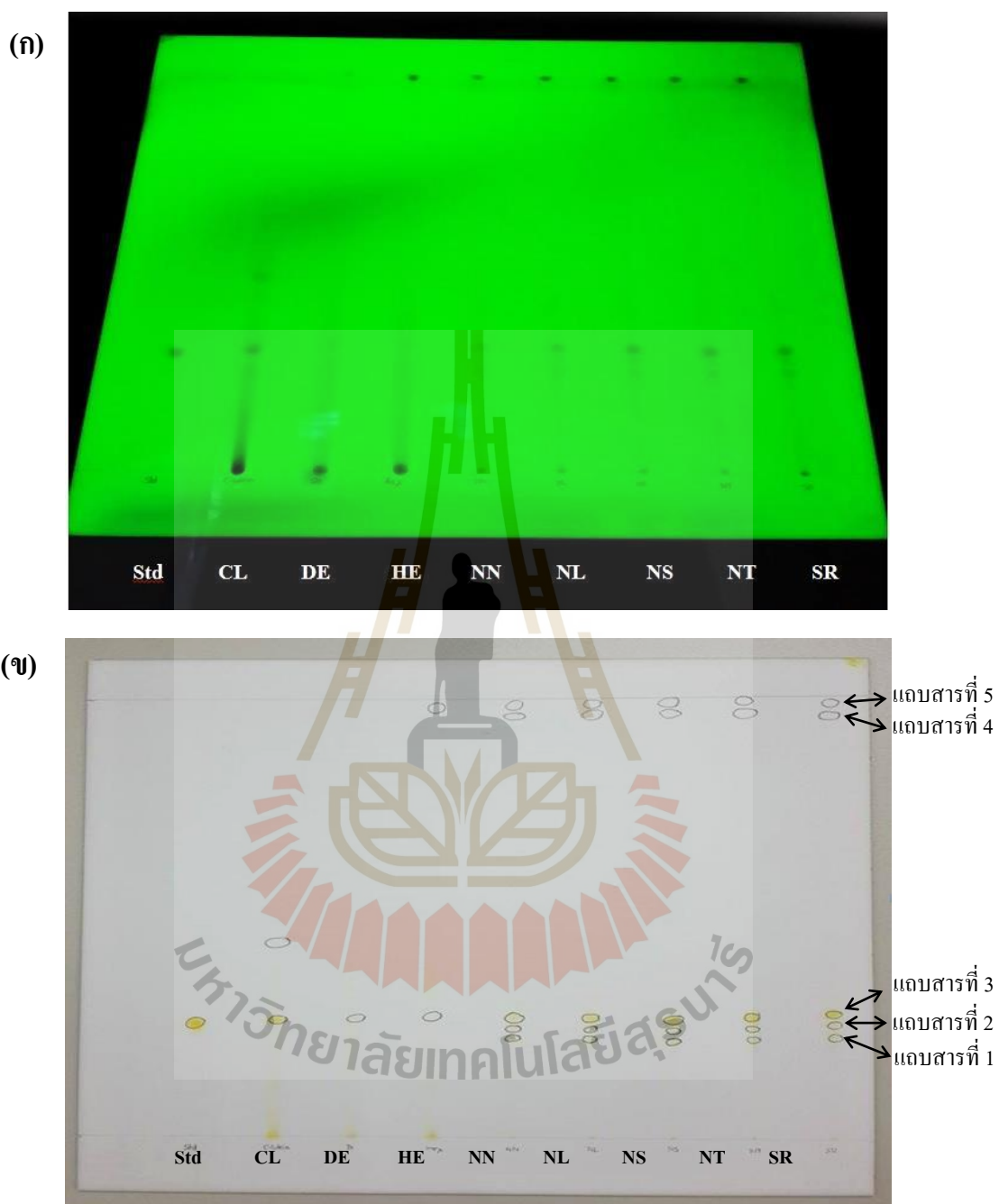


ภาพที่ 4.15 โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบลูทีนจากรังไหมเหลือง (ก) และสารสกัดหยาบลูทีนที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนด้วยน้ำ (ข) เฮกเซน (ค) และไดคลอโรมีเทน (ง) จากการสแกนด้วยวิธี UV-Vis spectroscopy (ต่อ)

4.4 การแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือทิ้งโดยวิธี thin layer chromatography (TLC)

เมื่อนำสารสกัดจากรังไหมเหลือทิ้งห้าสายพันธุ์มาแยกองค์ประกอบด้วย TLC โดยใช้ โทลูอินที่มีเมทานอลอยู่ร้อยละ 5 เป็น developing solvent (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004) และเปรียบเทียบค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารขององค์ประกอบที่แยกได้กับสารละลายมาตรฐาน ลูทีน องค์ประกอบที่แยกได้แสดงในภาพที่ 4.16 จากการเปรียบเทียบค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารขององค์ประกอบในสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือทิ้งกับสารมาตรฐานลูทีน พบว่าเมื่อใช้โทลูอินที่มีเมทานอลเป็นส่วนผสมร้อยละ 5 เป็นตัวกลางเคลื่อนที่ และตรวจสอบด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลือทิ้งปรากฏแถบสารเป็นสีดำจำนวน 5 แถบสาร (ภาพที่ 4.16ก) โดยแถบสารที่ 3 ของสารสกัดลูทีนจากรังไหมแต่ละสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน แซนโทฟิลล์ ซึ่งมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 0.26 แสดงว่าแถบสารที่ 3 ของสารสกัด คือ ลูทีน ส่วนแถบสารที่ 1 2 4 และ 5 อาจเป็นสารในกลุ่มแว็กซ์หรือสารฟีนอลิก เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ข้างต้นพบว่าลูทีนจากรังไหมพันธุ์นางน้อยมีแว็กซ์เป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับการหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดที่พบว่า สารสกัดลูทีนจากรังไหมทั้ง 5 สายพันธุ์มีสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ และจากการแยกสารสกัดหยาบแบ่งส่วนพบว่า สารสกัดจากไคคโลโรมีเทนมีแถบสารปรากฏเพียงหนึ่งแถบและมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 0.27 ซึ่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานแซนโทฟิลล์ แสดงว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วนทำให้ได้สารสกัดลูทีนที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-Vis spectroscopy ข้างต้นที่พบว่าสารสกัดจากไคคโลโรมีเทนสเปกตรัมคล้ายกับสารมาตรฐานลูทีนเช่นกัน

อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นผลในเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นว่าการแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายแบบไล่ช้าสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของลูทีนได้ โดยเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาและศึกษาต่อไป ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ ซึ่งวิธีนี้เหมาะที่จะนำไปพัฒนาหากต้องการลูทีนที่มีความบริสุทธิ์สูงเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน และยารักษาโรคต่อไปได้



ภาพที่ 4.16 การแยกองค์ประกอบของสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองโดยวิธี TLC (ข) เมื่อส่องดูภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ก)

หมายเหตุ: Std CL NN NS NT NL และ SR คือ สารมาตรฐานลูทีน ลูทีนทางการค้า ลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อย นางลิว นางคู่ย นางลาย และ สำโรง ตามลำดับ

4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

4.5.1 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP assay เป็นวิธีที่ใช้หาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กที่อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine [Fe^{3+} -TPTZ] ให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ ferrous tripyridyltriazine [Fe^{2+} -TPTZ] (Benzie and Strain, 1996) โดยทั่วไปแล้วสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์จะสามารถหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระได้ด้วยการให้ไฮโดรเจน (Duh, Du, and Yen, 1999) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่า ลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรงไหมเหลืองสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ [Fe^{2+} -TPTZ] ได้เช่นเดียวกับการศึกษาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีน เบต้าแคโรทีน และลูทีน) ในดอกดาวเรืองโดย Siriamornpuna, Kaisoon, and Meesoc (2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ของลูทีนจากดอกดาวเรืองโดย Sindhu, Preethi, and Kuttan (2010) พบว่าลูทีนมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กในการทดสอบด้วยวิธี FRAP จากตารางที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าลูทีนจากรงไหมเหลืองมีค่า IC_{50} น้อยกว่าลูทีนทางการค้า วิตามินซี และวิตามินอี แต่มีค่ามากกว่าบีเอชเอ แสดงว่าบีเอชเอมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} สูงกว่าลูทีนจากรงไหมเหลือง ลูทีนทางการค้า วิตามินซีและวิตามินอี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ของแคโรทีนอยด์เกิดจากระบบของพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวในโครงสร้าง โดยจำนวนของพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวส่งผลต่อความสามารถในการรีดิวซ์ด้วยเช่นกัน มีการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ของสารไฟโทอิน (phytoene) ไฟโทฟลูอิน (phytofluene) และนิวโรสปอริน (neurosporene) พบว่าแคโรทีนอยด์เหล่านี้ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เพราะมีจำนวนของพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวค่อนข้างต่ำ (3, 5 และ 9 ตามลำดับ) ในขณะที่ไลโคปีนที่มีจำนวนพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยว 11 คู่ ก่อให้เกิดการซ้อนเหลื่อมของออร์บิทัลโครโมฟอร์ (chromophores) ทำให้อนุมูลแคโรทีนอยด์ (carotenoid radical) มีความเสถียร เป็นสาเหตุให้แคโรทีนอยด์มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP (Mortensen and Skibsted, 1997) ในขณะเดียวกันยังมีการศึกษาผลของไอโอโนนริง (ionone ring) ของแอลฟาแคโรทีนและเบต้าแคโรทีน แล้วพบว่าวงที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุลกีดขวางการเข้าทำปฏิกิริยากับ Fe^{3+} -TPTZ (Jimenez-Escrig, Jimenez-Jimenez, Sanchez-Moreno, and Saura-Calixto, 2000; Miller et al., 1996) นอกจากนี้หมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะอยู่กับวงที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุลยังทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์ลดลงเนื่องจากผลของความเกะกะ (steric hindrance) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าความเกะกะของโมเลกุลทำให้ลูทีนมีความสามารถในการรีดิวซ์น้อยกว่าบีเอชเอ (Muller and Bohm, 2011) จึงทำให้มีค่า IC_{50} สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ พบว่า ลูทีนจากรงไหมเหลืองสายพันธุ์นางค่วยและนางลี้มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์นางน้อยและนางลาย

ในขณะที่ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์สำโรงมีความสามารถในการรีดิวซ์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.7) โดยบีเอชเอ วิตามินซี วิตามินอี และลูทีนทางการค้ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.041 0.083 0.110 และ 0.105 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางลาย นางน้อย นางสัว นางตุ่ย และสำโรง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.068 0.062 0.053 0.056 และ 0.073 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งค่า IC_{50} ของลูทีนจากรังไหมเหลืองมีค่าต่ำกว่าวิตามินอี เฉลี่ย 1.8 เท่า และต่ำกว่าลูทีนทางการค้าเฉลี่ย 1.7 เท่า ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าลูทีนทางการค้าโดยเฉลี่ย 18.3 เท่า ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแคโรทีนอยด์กับความสามารถในการรีดิวซ์ที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบของผักแม้ว (*Sechium edule*) โดย Fidrianny, Darmawati and Sukrasno (2004) พบว่าทั้งสารฟีนอลิก และแคโรทีนอยด์มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} สอดคล้องกับการศึกษาโดย Aaby, Hvattum and Skrede (2004) ที่พบว่าสารฟีนอลิก มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าสารฟีนอลิกซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากรังไหมเหลืองช่วยทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} มากกว่าลูทีนทางการค้า

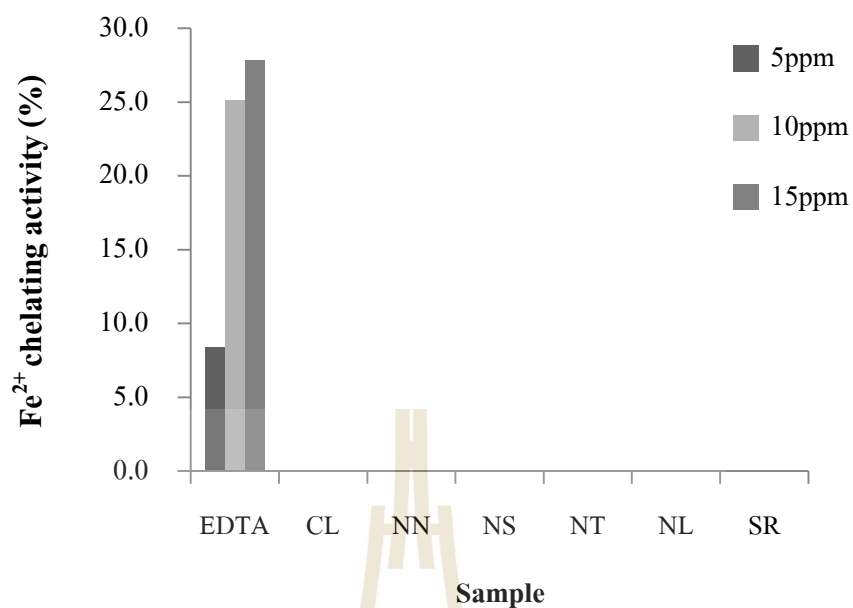
ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ลดลงร้อยละ 50 ของลูทีนจากรังไหมเหลือง ลูทีนทางการค้าและสารมาตรฐานอ้างอิง

ตัวอย่าง	IC_{50} (mM) $\pm$ SD
บีเอชเอ (สารมาตรฐานอ้างอิง)	0.041 $\pm$ 0.001 ^g
วิตามินอี	0.110 $\pm$ 0.005 ^a
วิตามินซี	0.083 $\pm$ 0.001 ^b
ลูทีนทางการค้า	0.105 $\pm$ 0.005 ^a
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย	0.062 $\pm$ 0.003 ^{de}
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางสัว	0.053 $\pm$ 0.002 ^f
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางตุ่ย	0.056 $\pm$ 0.003 ^{ef}
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางลาย	0.068 $\pm$ 0.010 ^{cd}
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์สำโรง	0.073 $\pm$ 0.004 ^c

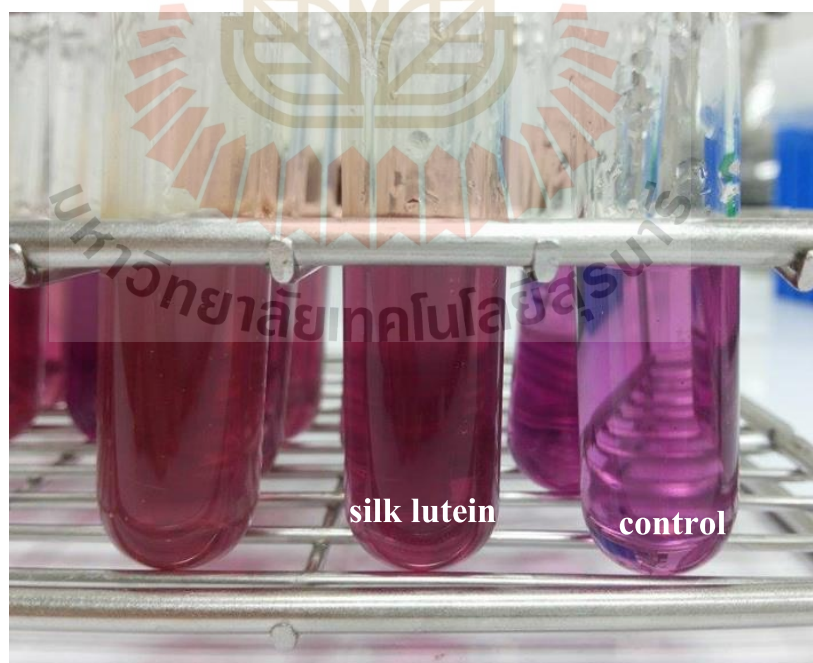
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c,d}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น

4.5.2 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Metal chelating activity assay

เป็นวิธีที่ใช้วัดความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ เนื่องจากโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาในการเกิดอนุมูลอิสระ จากการทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของลูทีน พบว่า ทั้งลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลือทิ้งไม่มีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ (ภาพที่ 4.18) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบน้อยเกินไป ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการจับกับโลหะของสารสกัดจากต้นว่าตายหงายเป็น (*Kalanchoe pinnata*) โดย Mohan, Balamurugan, Salini, and Rekha (2012) พบว่าสารสกัดดังกล่าวซึ่งประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีน และไลโคปีน มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 เท่ากับ 909.91 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่อีดีทีเอซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงมีค่าเท่ากับ 50.70 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในการทดสอบเมื่อใช้ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นสูง พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างลูทีนสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (ภาพที่ 4.19) สอดคล้องกับการศึกษาความสามารถในการจับโลหะของแอลฟาและเบต้าแคโรทีนที่สกัดจากน้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil) โดย Gupta and Ghosh (2013) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นสูงแอลฟาและเบต้าแคโรทีนจะรบกวนการสร้าง ferrous-ferrozine complex ซึ่งเป็นผลกระทบจากความเกาะเกาะของโครงสร้างแคโรทีนที่ประกอบด้วยสายคาร์บอนที่มีขนาดใหญ่ (bulky carbon chain) กีดขวางสารประกอบที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated group) จากการทำหน้าที่เป็นสารคีเลต (chelating agents) นอกจากนี้การเพิ่มระดับความเข้มข้นของแอลฟาและเบต้าแคโรทีนยังทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้น ส่งผลให้ค่าความสามารถในการจับโลหะ (metal chelating activity) ลดลง ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลูทีน



ภาพที่ 4.17 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะของลูทีนและสารมาตรฐานอ้างอิง
หมายเหตุ: NN NS NT NL และ SR คือ ไหมเหลืองสายพันธุ์นางน้อย นางสีว นางตุ่ย นาง-
ลาย และ ลำโพง ตามลำดับ; CL คือ ลูทีนทางการค้า



ภาพที่ 4.18 สีของสารละลายหลังทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกคลอไรด์และเฟอร์โรซีน

4.5.3 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity

วิธี ABTS เป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์ โดยจะศึกษาจากสีที่จางลงของสารละลายอนุมูลเอปิตีเอส (ABTS^{•+}) ซึ่งจากการทดลองพบว่า ลูทีนทางการค้าและจากรังไหมเหลืองสามารถยับยั้งอนุมูลเอปิตีเอสได้ โดยลูทีนจากรังไหมเหลืองสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเอปิตีเอสได้ดีกว่าลูทีนทางการค้า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พบว่า สารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า ลูทีนจากรังไหมเหลืองสามารถยับยั้งอนุมูลเอปิตีเอสได้ดีที่สุด สูงกว่าวิตามินอี วิตามินซี และบีเอชเอ ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิงเกือบ 2 เท่า (ตารางที่ 4.8) สอดคล้องกับการศึกษาโดย Bhattacharyya, Datta, Mallick, Dhar, and Ghosh (2010) ที่พบว่า ลูทีนในรูปเอสเทอร์ที่สกัดจากดอกดาวเรืองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเอปิตีเอส และความสามารถดังกล่าวจะแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองสีส้ม สีเหลืองและสีแดง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของลูทีนจากดอกดาวเรืองโดย Sindhu et al. (2010) แล้วพบว่าลูทีนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเอปิตีเอสได้เช่นกัน

มีรายงานว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของลูทีนอาจเนื่องมาจากโครงสร้างทางเคมีแบบพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวเช่นเดียวกับเบต้าแคโรทีน (Young and Lowe, 2001) นอกจากนี้ หมู่ไฮดรอกซิลที่ปลายทั้งสองข้างของโครงสร้างทำให้ลูทีนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าแคโรทีนอยด์ตัวอื่น (Miki, 1991; Wang et al., 2006) จากตารางที่ 4.8 พบว่า วิตามินอี วิตามินซีและบีเอชเอ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเอปิตีเอสได้ดีกว่าลูทีนทางการค้า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีเกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่รอบนอกของโมเลกุล ทำปฏิกิริยากับอนุมูลร่วมกับพันธะคู่ที่อยู่ใกล้เคียง (Miller, Sampson, Candeias, Bramley, and Rice-Evans, 1996; Müller, Fröhlich, and Böhm, 2011) จึงทำให้เกิดความเสถียรของโครงสร้างเรโซแนนซ์ (resonance-stabilization) (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996; El-Agamey et al., 2004) ในทางกลับกันแคโรทีนอยด์มีการเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวเกิดเป็นสายโซ่โพลีอิน (polyene chain) ซึ่งไพออิเล็กทรอนิกส์ (π -electron) จะเคลื่อนที่ (delocalized) ได้อย่างมีประสิทธิภาพในบริเวณสายโซ่ดังกล่าว (Richard, and Semba 2007) ดังนั้นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของแคโรทีน เช่น ไลโคปีน แอลฟาและเบต้าแคโรทีน คือสายโซ่โพลีอิน (conjugated polyene chain) ตรงกลางของโมเลกุล (Young and Lowe, 2001) Muller and Bohm (2011) เสนอแนะว่าในความเป็นจริงอาจเป็นเรื่องยากสำหรับอนุมูลอิสระที่มีความเกะกะ (steric) ของโมเลกุลในการทำปฏิกิริยากับแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะแคโรทีนอยด์ที่มีวงแหวนสองวงอยู่ในโครงสร้าง (bicyclic structures) ทำให้ลูทีนทางการค้ามีความสามารถในการต้านอนุมูลเอปิตีเอสได้น้อยกว่าวิตามินซี วิตามินอีและบีเอชเอ โดย

วิตามินซี บีเอชเอ วิตามินอี และลูทีนทางการค้ามีค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 เท่ากับ 0.934 1.023 1.147 และ 1.401 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางสาว นางน้อย นางคู่ย นางลาย และสำโรง มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 เท่ากับ 0.507 0.590 0.612 0.627 และ 0.636 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 ของลูทีนทางการค้ามีค่ามากกว่าลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลการเสริมฤทธิ์ของสารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดลูทีนจากรังไหมมีค่ามากกว่า มีรายงานว่าสารฟีนอลิกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลิกในน้ำผึ้งกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย Piljac-Zegarac, Stipčević, and Belščak (2009) พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเอปิตีเอสและดีพีพีเอชกับปริมาณของสารฟีนอลิก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืชโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen-donating) ของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้าง (Lindsay and Astley, 2002) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอน (electron-donating) ซึ่งสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ (Bajpai, Pande, Tewari, and Prashad, 2005)

ตารางที่ 4.8 ค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระเอปิตีเอสลดลงร้อยละ 50 ของลูทีนจากรังไหมเหลือง
ลูทีนทางการค้าและสารมาตรฐานอ้างอิง

ตัวอย่าง	IC ₅₀ (mM) ± SD
บีเอชเอ (สารมาตรฐานอ้างอิง)	1.023±0.023 ^c
วิตามินอี (สารมาตรฐานอ้างอิง)	1.147±0.021 ^b
วิตามินซี (สารมาตรฐานอ้างอิง)	0.934±0.026 ^d
ลูทีนทางการค้า	1.401±0.116 ^a
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย	0.590±0.020 ^c
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางสาว	0.507±0.006 ^c
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางคู่ย	0.612±0.010 ^c
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางลาย	0.627±0.021 ^c
ลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์สำโรง	0.636±0.012 ^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c,d}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.5.4 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging activity of DPPH radical

อนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว ใช้วัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัดการลดลงของสีของสารละลายอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชเมื่อได้รับอิเล็กตรอน จากการทดลองพบว่า ลูกทึนจากรังไหมเหลืองสามารถต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชได้ดีกว่าบีเอชเอ และลูกทึนทางการค้า โดยมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 ต่ำกว่าบีเอชเอ และลูกทึนทางการค้าเฉลี่ย 2.3 และ 4.0 เท่า ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาโดย Hsu et al. (2011) ที่พบว่าลูกทึนจากดอกเดซี่ลิลี่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชได้ถึงร้อยละ 7 ถึง 93 เมื่อใช้ลูกทึนความเข้มข้น 0.3 ถึง 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพมากกว่าสารมาตรฐาน Trolox ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Subagio and Morita (2001) พบว่าลูกทึนจากดอกดาวเรืองทั้งในรูปอิสระและเอสเทอร์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช โดยที่ค่าร้อยละการคงอยู่ของอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช (%remaining DPPH) ของลูกทึนในรูปอิสระและเอสเทอร์ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีน เบต้าแคโรทีน และลูกทึน) ในดอกดาวเรืองโดยใช้วิธี scavenging activity of DPPH radical (Siriamornpuna, Kaisoona, and Meesoc, 2012) แล้วพบว่าแคโรทีนอยด์จากดอกดาวเรืองสด ดอกดาวเรืองที่ทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง และทำแห้งด้วยลมร้อนเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 67.65 และ 52.4 ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 ของลูกทึนจากรังไหมเหลืองมีค่าต่ำกว่าลูกทึนทางการค้าและบีเอชเออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าลูกทึนจากรังไหมเหลืองสามารถต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชได้ดีกว่า สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ที่พบว่าลูกทึนจากรังไหมเหลืองมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเอบีทีเอสได้ดีกว่าลูกทึนทางการค้าและบีเอชเอ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดลูกทึนจากรังไหมเหลืองเป็นสารสกัดหยาบ และจากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าลูกทึนทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ดังที่กล่าวมาแล้วว่าสารฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืชโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้าง (Lindsay and Astley, 2002) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอน (electron-donating) ซึ่งสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ (Bajpai, Pande, Tewari, and Prashad, 2005) มีการรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Djeridane et al., 2006; Kim, Chun, Kim, Moon, and Lee, 2003; Kim, Jeong, and Lee, 2003) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Piljac-Zegarac et al. (2009) ที่พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอสและดีฟิฟิเอชกับปริมาณของสารฟีนอลิก เช่นเดียวกับการศึกษาของ John and Shahidi (2010) ที่พบว่าสารฟีนอลิกใน

ถั่วบราซิล (Brazil nut) สามารถต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชได้โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระดังกล่าว

ลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางสาวมีความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลูทีนจากรงไหมสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการทดสอบ โดยมีค่าเท่ากับ 0.139 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางสาวสามารถต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชได้ดีที่สุด รองลงมาคือลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์สำโรง พันธุ์นางค้อย พันธุ์นางน้อย และพันธุ์นางลาย ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) แม้ว่าสารฟีนอลิกจะเป็นปัจจัยที่ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลูทีนจากรงไหมเหลืองมากกว่าลูทีนทางการค้า แต่เมื่อพิจารณาระหว่างสายพันธุ์พบว่า ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยมีค่ามากที่สุด ในขณะที่ระหว่างการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี กลับพบว่า ลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางสาวมีความเข้มข้นมากที่สุด จากการแยกองค์ประกอบของสารสกัดรงไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ด้วยวิธี TLC (ข้อ 4.4) พบว่าสารสกัดลูทีนจากรงไหมเหลืองมีสารอื่นเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจากการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดลูทีนจากรงไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน แม้จะไม่มีการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) แต่อาจคาดเดาได้ว่าปริมาณองค์ประกอบเหล่านั้นส่งผลต่อความแตกต่างของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระระหว่างสายพันธุ์

ตารางที่ 4.9 ค่าความเข้มข้นที่ทำให้อนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชลดลงร้อยละ 50 ของลูทีนจากรงไหมเหลืองลูทีนทางการค้าและสารมาตรฐานอ้างอิง

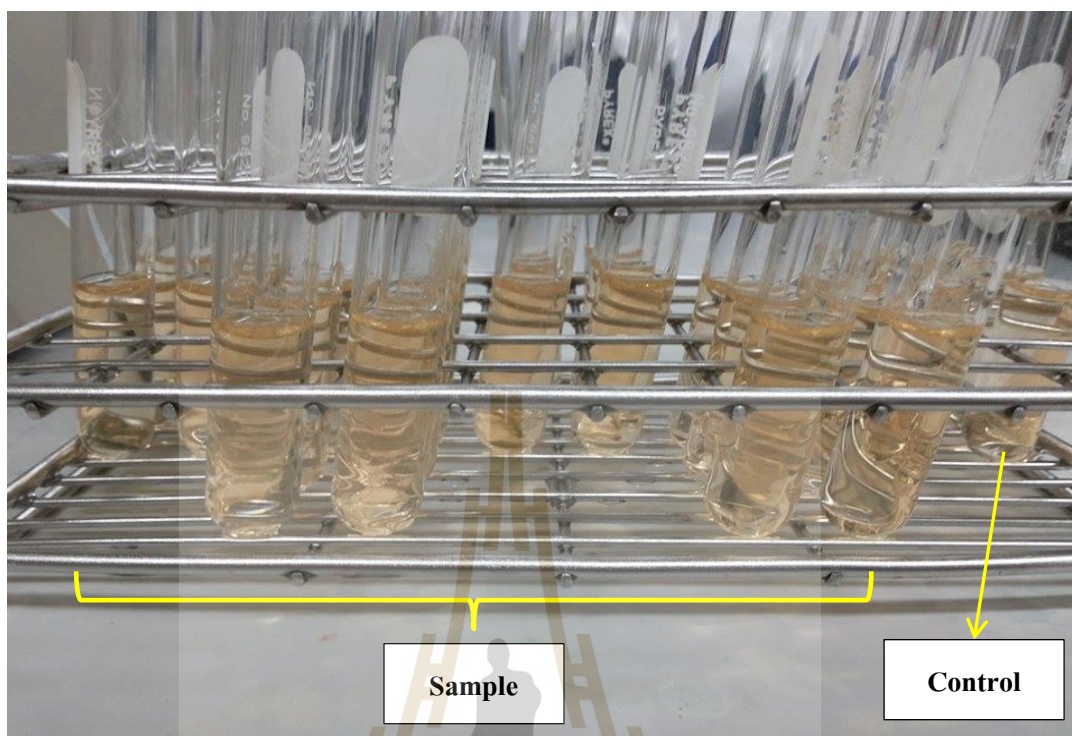
ตัวอย่าง	IC ₅₀ (mM) ± SD
บีเอชเอ (สารมาตรฐานอ้างอิง)	0.455±0.002 ^b
ลูทีนทางการค้า	0.782±0.009 ^a
ลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย	0.228±0.003 ^d
ลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางสาว	0.139±0.002 ^f
ลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางค้อย	0.231±0.002 ^d
ลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์นางลาย	0.293±0.003 ^c
ลูทีนจากรงไหมเหลืองพันธุ์สำโรง	0.164±0.006 ^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c,d}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.5.5 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging activity of hydroxyl radical

อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไว และถือได้ว่าเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายได้มากที่สุดในกลุ่มของอนุมูลออกซิเจน โดยการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่อย่างต่อเนื่อง (Sakanaka, Tachibana, and Okada, 2005) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลโดยวัดจากการสลายตัวของน้ำตาลดีออกซีไรโบสที่ถูกจับโดยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่างและตัวควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.19) ส่งผลให้ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลมีค่าเป็นศูนย์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอทานอลซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมตัวอย่างส่งผลต่อการทดสอบ โดย Li (2003) พบว่า ตัวทำละลายอินทรีย์สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ โดยเอทานอล ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่สามารถจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ดีที่สุด แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนตัวทำละลายโดยเลือกใช้เฮกเซนซึ่ง Li จัดอยู่ในกลุ่มที่มีผลต่อการทดสอบน้อยที่สุด แต่จากการทดสอบพบว่า ตัวอย่างลูทีนที่ละลายในเฮกเซนไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับสารผสมในระบบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารทุกตัวที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาละลายในน้ำ ในขณะที่เฮกเซนซึ่งเป็นสารที่มีขั้วน้อยไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับสารผสมดังกล่าว (ภาพที่ 4.20) เป็นสาเหตุให้สารละลายหลังจากทดสอบมีสีชมพู เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร พบว่ามีค่าสูงใกล้เคียงกับตัวควบคุม (ภาพที่ 4.21) และมีค่าต่างจากการทดสอบในตัวอย่างที่ละลายในเอทานอล

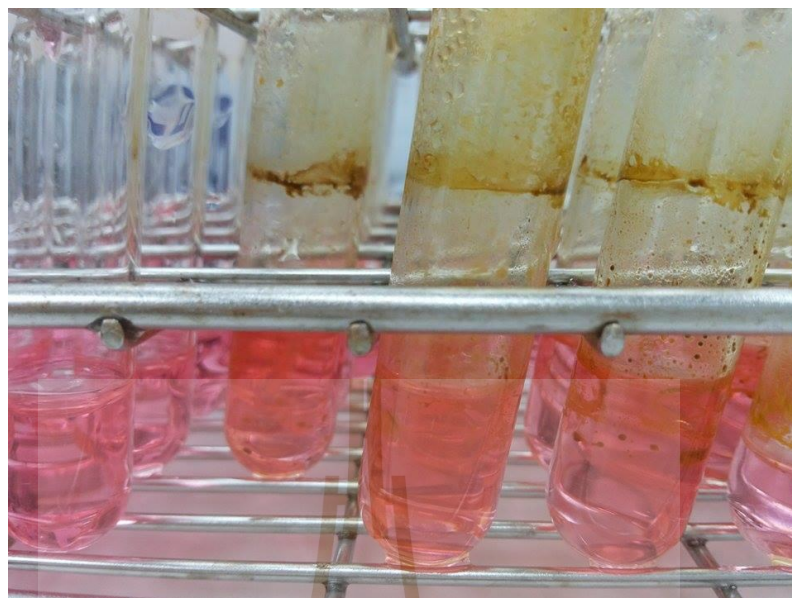
ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ด้วยวิธีดีออกซีไรโบส ไม่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลูทีน แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอปิตีเอสและดีฟิฟิเอซในเบื้องต้น พบว่าลูทีนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวได้ดีว่าลูทีนทางการค้า อีกทั้งนี้ยังมีรายงานว่า ลูทีนจากดอกดาวเรืองสามารถต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical) และยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ในหลอดทดลองได้ (Sindhu et al., 2010) และจากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดพบว่า สารสกัดลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์มีสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีรายงานว่าสารฟีนอลิกในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แชนโทน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่สองหมู่ขึ้นไป (functional group) จะมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น ในขณะที่สารโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxy phenol อยู่ในโมเลกุลสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน (Fe^{2+} และ Cu^{2+}) เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการจับ (chelate) กับโลหะดังกล่าว (Sanchez-Moreno, Jimenez-Escoria, and Saura-Calixto, 2000) ดังนั้นลูทีนจากรังไหมเหลืองอาจมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีในร่างกายได้



ภาพที่ 4.19 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของตัวอย่างลูทีนที่ละลายในเอทานอล



ภาพที่ 4.20 สารผสมในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลก่อนการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก และกรดไทโอบาร์บิทรिक



ภาพที่ 4.21 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของตัวอย่างลูทีนที่ละลายในเฮกเซน

4.6 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ภาพที่ ๘3) พบว่า ลูทีนทางการค้ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 7.693 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อลูทีน 1 กรัม ซึ่งน้อยกว่าลูทีนจากโรงไหมเหลืองอย่างมีนัยสำคัญ และลูทีนจากโรงไหมเหลืองพันธุ์นางน้อยมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด คือ 147.669 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อลูทีน 1 กรัม รองลงมาคือ ลูทีนจากโรงไหมเหลืองพันธุ์ลำโรง นางสีว นางตุ่ย และนางลาย ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

จากการศึกษาโดย Radojković, Zeković, Vidović, Kočar, and Mašković (2012) พบว่า ในใบของต้นหม่อนชนิดที่ปลูกเพื่อกินผล (black mulberry, *Morus nigra* L.) และชนิดที่ปลูกเพื่อการเลี้ยงไหมเป็นหลัก (white mulberry, *Morus alba* L.) มีสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ โดยมีปริมาณเท่ากับ 115.232 และ 66.766 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 1 กรัมตัวอย่าง สอดคล้องกับการศึกษาของ Lee and Choi (2012) ที่พบว่าในใบหม่อนมีสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบอยู่ในช่วง 1,042.16 ถึง 1,871.97 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง และปริมาณสารดังกล่าวจะมีความแตกต่างกันเมื่อปลูกในพื้นที่ต่างกัน อีกทั้งยังมีรายงานว่าปริมาณสารฟีนอลิกในใบหม่อนขึ้นอยู่กับช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวด้วย (Zou et al., 2012) มีรายงานว่าสีของรังไหมมีความเกี่ยวข้องกับ

สารประกอบฟีนอลิกในใบหม่อน และปริมาณของสารสีในรังไหมแต่ละสายพันธุ์จะมีปริมาณแตกต่างกัน (Kurioka and Yamazaki, 2002) นอกจากนี้ยังศึกษาของ Kaskoos, Ali and Naquvi (2012) ที่พบสารประกอบฟีนอลิกในรังไหม (*Bombyx mori*) เช่นเดียวกับ Butkhu et al. (2012) ที่ศึกษาปริมาณสารโพลีฟีนอลในโปรตีนซีรีซินที่สกัดจากไหมที่กินใบหม่อน (*Bombyx mori*) และไหมที่ไม่กินใบหม่อน (Eri silkworm, *Samia ricini*) พบว่า ในโปรตีนซีรีซินจากไหมทั้งสองชนิดประกอบด้วยสารคาเทชิน (catechin) เควอซิทิน และอีพิกาทะชิน มีรายงานว่าสารฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืชโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม ของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้าง (Lindsay and Astley, 2002) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอนซึ่งสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ (Bajpai et al., 2005) ซึ่งความสามารถดังกล่าวส่งผลให้สารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากรังไหมเหลืองเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์

ตารางที่ 4.10 ปริมาณฟีนอลิกรวมของลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลือง

แหล่งของลูทีน	ปริมาณฟีนอลิกรวม			ปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ย (mg GAE/g lutein) $\pm$ SD
	1	2	3	
ลูทีนทางการค้า	8.969	6.234	7.875	7.693 $\pm$ 1.124 ^d
รังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย	148.023	148.555	146.428	147.669 $\pm$ 0.904 ^a
รังไหมเหลืองพันธุ์นางสาว	139.004	141.139	137.403	139.182 $\pm$ 1.531 ^b
รังไหมเหลืองพันธุ์นางต๋อย	140.884	138.531	134.296	137.904 $\pm$ 2.726 ^b
รังไหมเหลืองพันธุ์นางลาย	130.379	132.835	129.396	130.870 $\pm$ 1.446 ^c
รังไหมเหลืองพันธุ์สาวโรง	145.247	150.427	143.363	146.346 $\pm$ 2.987 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c,d}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 5

บทสรุป

จากการหาปริมาณลูทีนในรังไหมจากไหมเหลือง 5 สายพันธุ์ พบว่า รังไหมเหลืองพันธุ์สำโรงมีปริมาณลูทีนมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์นางลาย นางน้อยและนางสีว และนางคู่มีปริมาณน้อยที่สุด ซึ่งลูทีนที่ได้จากรังไหมเหลืองที่ผ่านการลอกกาไหมมีปริมาณมากกว่าลูทีนที่สกัดจากโปรตีนซีรีซิน ส่วนการศึกษาความคงตัวของลูทีน พบว่าอุณหภูมิและแสงสว่างมีผลต่อความคงตัวของลูทีน และลูทีนจากรังไหมเหลืองมีความคงตัวมากกว่าลูทีนทางการค้า โดยลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางน้อย นางลายและสำโรงมีความคงตัวมากกว่าสายพันธุ์นางคู่และนางน้อยที่อุณหภูมิ -80 และ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งมีแนวโน้มของการเสื่อมสลายแบบ two-stage first order kinetic นอกจากนี้การใช้วิตามินอีผสมกับลูทีนยังสามารถชะลอการเสื่อมสลายของลูทีนได้ทั้งในลูทีนทางการค้าและลูทีนจากรังไหมเหลือง โดยการผสมวิตามินอีปริมาณ 5 เท่าของปริมาณลูทีนทำให้ค่าครึ่งชีวิตเพิ่มมากขึ้นเฉลี่ย 5.5 เท่าของลูทีนที่ไม่ผสมวิตามินอี และจากศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาลูทีนคือ ผสมวิตามินอีอย่างน้อย 1 เท่าของปริมาณลูทีน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากออกซิเจนและแสงสว่าง สำหรับการสกัดแยกสารสกัดหยาบลูทีนด้วยตัวทำละลายแบบแบ่งส่วน พบว่าการใช้น้ำ เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน ทำให้สารสกัดลูทีนมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเมื่อตรวจวัดด้วยวิธี UV-Vis spectroscopy และ TLC ส่วนความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของลูทีนพบว่า ลูทีนจากรังไหมเหลืองมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กในการทดสอบด้วยวิธี FRAP มากกว่าลูทีนทางการค้า โดยลูทีนจากรังไหมเหลืองพันธุ์นางสีวและนางคู่สามารถรีดิวซ์เหล็กได้ดีที่สุด รองลงมาคือพันธุ์นางน้อย นางลายและสำโรงตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ลูทีนจากรังไหมเหลืองและลูทีนทางการค้ามีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเอปิตีเอส และดีพีพีเอช โดยลูทีนจากรังไหมเหลืองมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระทั้งเอปิตีเอส และดีพีพีเอชได้ดีกว่าลูทีนทางการค้าและบีเอชเอ โดยลูทีนจากรังไหมเหลืองสายพันธุ์นางสีวสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้ดีที่สุด ในขณะที่ลูทีนจากรังไหมเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเอปิตีเอสได้ไม่แตกต่างกันและในการหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดพบว่าลูทีนจากรังไหมเหลืองมีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดมากกว่าลูทีนทางการค้า ซึ่งลูทีนพันธุ์นางน้อยและสำโรงมีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดมากที่สุด

ข้อเสนอแนะการใช้ประโยชน์

1. สายพันธุ์ใหม่เหลืองที่เหมาะสมกับการค้าคือ พันธุ์นางลาย นางคู่ย นางน้อย นางลิ้ว และ ลำโรง ตามลำดับ

2. สภาพะการเก็บรักษาที่เหมาะสม คือ ลูกที่ผ่านการทำแห้ง ผสมวิตามินอีอย่างน้อย 1 เท่า ของปริมาณลูทิน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากออกซิเจนและแสงสว่าง นอกจากนี้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะเดียวกันยังสามารถเก็บลูทินได้นาน เกือบสองปีโดยที่ลูทินมีปริมาณลดลงร้อยละ 50

3. การประยุกต์ใช้แบบจำลองทางจลนศาสตร์ในการนำไปผลิตลูทินเพื่อการค้าให้ถูกต้อง ตามกฎหมายอาหาร คือ ต้องมีสารธรรมชาติที่เป็นองค์ประกอบ หรือเติมเข้าไปเพื่อเป็นส่วนประกอบ ในอาหารเท่ากับร้อยละ 80 ของปริมาณเริ่มต้น ดังนั้นควรระบุปริมาณลูทินข้างฉลากจากปริมาณ เริ่มต้นในการเปลี่ยนแปลงช่วงที่สอง เนื่องจากเป็นช่วงที่ลูทินมีอัตราการสลายตัวช้า ทำให้ ผลิตภัณฑ์สามารถเก็บรักษาได้นานโดยไม่ผิดกฎหมาย และสามารถคำนวณปริมาณที่เพียงพอต่อ ความต้องการในแต่ละวันของผู้บริโภคได้





รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

- กรมหม่อนไหม. (2554). พันธุ์ไหมชนิดฟักออกตลอดปี [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://61.47.35.120/newstartpage/index.cfm?page=archiverequest&contentId=140483>
- สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ. (2549). เกี่ยวกับไหม [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://203.154.212.59/qthaisilk/inside.php?comoption=page&aid=26>
- ศูนย์วิจัยรักษาสวนจิตรลดา. (2547). โรคจอประสาทตาเสื่อม [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.eye.go.th>
- Aaby, K., Hvattum, E., and Skrede, G. (2004). Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 4595-4603.
- Aimjongjun, S., Sutheerawattananonda, M., and Limpeanchob, N. (2013). Silk lutein extract and its combination with vitamin E reduce UVB-mediated oxidative damage to retinal pigment epithelial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 124: 34-41.
- Alves-Rodrigues, A., and Shao, A. (2004). The science behind lutein. **Toxicology Letters**. 150: 57-83.
- Aman, R., Bayha, S., Carle, R., and Schieber, A. (2004). Determination of carotenoid stereoisomers in commercial dietary supplements by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 6086-6090.
- Arnal, E., Miranda, M., Almansa, I., Muriach, M., Barcia, J. M., Romero, F. J., Diaz-Llopis, M., and Bosch-Morell, F. (2009a). Lutein prevents cataract development and progression in diabetic rats. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**. 247: 115-120.
- Arnal, E., Miranda, M., Barcia, J., Bosch-Morell, F., and Romero, F. J. (2010). Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. **Neuroscience**. 166: 271-278.

- Arnal, E., Miranda, M., Johnsen-Soriano, S., Alvarez-Nolting, R., Diaz-Llopis, M., Araiz, J., Cervera, E., Bosch-Morell, F., and Romero, F. J. (2009b). Beneficial effect of Docosahexanoic acid and lutein on retinal structural, metabolic, and functional abnormalities in diabetic rats. **Current Eye Research**. 34: 928-938.
- Astner, S., Wu, A., Chen, J., Philips, N., Rius-Diaz, F., Parrado, C., Mihm, M. C., Goukassian, D. A., Pathak, M. A., and Gonzalez, S. (2007). Dietary lutein/zeaxanthin partially reduces photoaging and photocarcinogenesis in chronically UVB-irradiated Skh-1 hairless mice. **Skin Pharmacology and Physiology**. 20: 283-291.
- Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S. K., and Prashad, D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of some food and medicinal plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. 4: 287-291.
- Barker, F. M., Snodderly, D. M., Johnson, E. J., Schalch, W., Koepcke, W., Gerss, J., and Neuringer, M. (2011b). Nutritional manipulation of primate retinas. V: effects of lutein, zeaxanthin and ne3 fatty acids on retinal sensitivity to blue light damage. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 18: 3934-3942.
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**. 45: 115-134.
- Bechoff, A., Dhuique-Mayer, C., Dornier, M., Tomlins, K. I., Boulanger, R., Dufour, D., and Westby, A. (2010). Relationship between the kinetics of β -carotene degradation and formation of norisoprenoids in the storage of dried sweet potato chips. **Food Chemistry**. 121: 348-357.
- Bedecarrats, G. Y., and Leeson, S. (2006). Dietary lutein influences immune response in laying hens. **Journal of Applied Poultry Research**. 15: 183-189.
- Benzie, I. F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. 239: 70-76.
- Bernstein, P. S., Zhao, D. Y., Wintch, S. W., Ermakov, I. V., McClane, R. W., and Gellermann, W. (2002). Resonance Raman measurement of macular carotenoids in normal subjects and in age-related macular degeneration patients. **Ophthalmology**. 109: 1780-1787.

- Bezbradica, D., Milic-Askabic, J., Petrovic, S. D., and Siler-Marinkovic, S. (2005). An investigation of influence of solvent on the degradation kinetics of carotenoids in oil extracts of *Calendula officinalis*. **Journal of Serbian Chemical Society**. 70: 115-124.
- Bhattacharyya, S., Datta, S., Mallick, B., Dhar, P., and Ghosh, S. (2010). Lutein content and *in vitro* antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (*Tagetes patula* L.) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 8259-8264.
- Bone, R. A., Landrum, J. T., Friedes, L. M., Gomez, C. M., Kilburn, M. D., Menendez, E., Vidial, I., and Wang, W., (1997). Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. **Experimental Eye Research**. 64: 211-218.
- Bone, R. A., Landrum, J. T., Mayne, S. T., Gomez, C. M., Tibor, S. E., and Twaroska, E. E. (2001). Macular pigment in donor eyes with and without AMD: A case-control study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 42: 235-240.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie**. 28: 25-30.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**. 67: 21-33.
- Burke, M., Edge, R., Land, E. J., and Truscott, T. G. (2001). Characterisation of carotenoid radical cations in liposomal environments: Interaction with vitamin C. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. 60: 1-6.
- Butkhup, L., Jeenphakdee, M., Jorjong, S., Samappito, S., Samappito, W., and Butimal, J. (2012). Phenolic composition and antioxidant activity of Thai and Eri silk sericins. **Food Science and Biotechnology**. 21: 389-398.
- Carpentier, S., Knaus, M., and Suh, M. Y. (2009). Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 49: 313-326.
- Chang, S., Erdman, J. W. Jr., Clinton, S. K., Vadiveloo, M., Strom, S. S., Yamamura, Y., Duphorne, C. M., Spitz, M. R., Amos, C. I., Contois, J. H., Gu, X., Babaian, R. J., Scardino, P. T., and Hursting, S. D. (2005). Relationship between plasma carotenoids and prostate cancer. **Nutrition and Cancer**. 53: 127-134.
- Chasan-Taber, L., Willett, W. C., Seddon, J. M., Stampfer, M. J., Rosner, B., Colditz, G. A., Speizer, F. E., and Hankinson, S. E. (1999). A prospective study of carotenoid and

- vitamin A intake and cataract extraction among U.S. women. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70: 509-516.
- Chen, B., and Huang, J. (1998). Degradation and isomerization of chlorophyll a and β -carotene as affected by various heating and illumination treatments. **Food Chemistry**. 62: 299-307.
- Chen, H. E., Peng, H. Y., and Chen, B. H. (1996). Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice. **Food Chemistry**. 57: 497-503.
- Chew, B. P., and Park, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. **Journal of Nutrition**. 134: 257-261.
- Cho, H., Kim, M. K., Lee, J. K., Son, S. K., Lee, K. B., Lee, J. M., Lee, J. P., Hur, S. Y., and Kim, J. H. (2009). Relationship of serum antioxidant micronutrients and sociodemographic factors to cervical neoplasia: A case-control study. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. 47: 1005-1012.
- Chong, E. W., Wong, T. Y., Kreis, A. J., Simpson, J. A., and Guymer, R. H. (2007). Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**. 335: 755-760.
- Chucair, A. J., Rotstein, N. P., SanGiovanni, J. P., During, A., Chew, E. Y., and Politi, L. E. (2007). Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: Relation with docosahexaenoic acid. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 48: 5168-5177.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**. 97: 654-660.
- Duh, P., Du, P., and Yen, G. (1999). Action of methanolic extract of mung bean hull as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**. 37: 1055-1061.
- Edge, R., Land, E. J., McGarvey, D., Mulroy, L., and Truscott, T. G. (1998). Relative one-electron reduction potentials of carotenoid radical cations and the interactions of carotenoids with the vitamin E radical cation. **Journal of the American Chemical Society**. 120: 4087-4090.
- El-Agamey, A., Cantrell, A., Land, E. J., and McGarvey, D. J., and Truscott, T. G. (2004). Are dietary carotenoids beneficial? Reactions of carotenoids with oxy-radicals and singlet oxygen. **Photochemistry and Photobiological Sciences**. 3: 802-811.

- El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., and Young, A. J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 430: 37-48.
- Fernandez, M. M., and Afshari, N. A. (2008). Nutrition and the prevention of cataracts. **Current Opinion in Ophthalmology**. 19: 66-70.
- Fidrianny, I., Darmawati, A., and Sukrasno. (2004). Antioxidant capacities from different polarities extracts of cucurbitaceae leaves using FRAP, DPPH assays and correlation with phenolic, flavonoid, carotenoid content. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 6: 858-862.
- Furr, H. C., and Cark, R. M. (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 8: 364-377.
- Giese, E. C., Gascon, J., Anzelmo, G., Barbosa, A. M., Alves da Cunha, M. A., and Dekker, R. F. H. (2015). Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of the β -glucans: botryosphaeran, laminarin, curdlan and lasiodiplodan. **International Journal of Biological Macromolecules**. 72: 125-130.
- Gulrajani, M. L., Purwar, R., Prasad, R. K., and Joshi, M. (2009). Studies on structural and functional properties of sericin recovered from silk degumming liquor by membrane technology. **Journal of Applied Polymer Science**. 113: 2796-2804.
- Gupta, S. S., and Ghosh, M. (2013). *In vitro* antioxidative evaluation of α - and β -carotene, isolated from crude palm oil. **Analytical Methods in Chemistry**. 2013: 1-10.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., and Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**. 165: 215-219.
- Ham, Jr., W. T., Mueller, H. A., and Sliney, D. H. (1976). Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. **Nature**. 260: 153-155.
- Han, R. M., Zhang, J. P., and Skibsted, L. H. (2012). Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as Antioxidants. **Molecules**. 17: 2140-2160.
- Harashima, K., Ohno, T., Sawachika, T., Hidaka, T., and Ohnishi, E. (1972). Carotenoids in orange pupae of the swallowtail, *Papilio xuthus*. **Insect Biochemistry**. 2: 29-48.
- Holden, J. M., Eldridge, A. L., Beecher, G. R., Buzzard, I. M., Bhagwat, S., Davis, C. S., Douglass, L. W., Gebhardt, S., Haytowitz, D., and Schakel, S. (1999). Carotenoid content

- of US foods: An update of the database. **Journal of Food Composition and Analysis**. 12: 169-196.
- Hsu, Y. W., Tsai, C. F., Chen, W. K., Ho, Y. C., and Lu, F. J. (2011). Determination of lutein and zeaxanthin and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide extract from daylily (*Hemerocallis disticha*). **Food Chemistry**. 129: 1813-1818.
- Hu, J., La Vecchia, C., Negri, E., DesMeules, M., and Mery, L. (2009). Dietary vitamin C, E, and carotenoid intake and risk of renal cell carcinoma. **Cancer Causes and Control**. 20: 1451-1458.
- Hung, R. J., Zhang, Z. F., Rao, J. Y., Pantuck, A., Reuter, V. E., Heber, D., and Lu, Q. Y. (2006). Protective effects of plasma carotenoids on the risk of bladder cancer. **Journal of Urology**. 176: 1192-1197.
- Jeong, N. H., Song, E. S., Lee, J. M., Lee, K. B., Kim, M. K., Yun, Y. M., Lee, J. K., Son, S. K., Lee, J. P., Kim, J. H., Hur, S. Y., and Kwon, Y. I. (2009). Preoperative levels of plasma micronutrients are related to endometrial cancer risk. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**. 88: 434-439.
- Jimenez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Sanchez-Moreno, C., and Saura-Calixto, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80: 1686-1690.
- Jin, X. H., Ohgami, K., Shiratori, K., Suzuki, Y., Hirano, T., Koyama, Y., Yoshida, K., Ilieva, L., Iseki, K., and Ohno, S. (2006). Inhibitory effects of lutein on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 47: 2562-2568.
- John, A. J., and Shahidi, F. (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Food**. 2: 196-209.
- Jouni, Z. E., and Wells, M. A. (1996). Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from the midgut of the silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Biological Chemistry**. 271: 14722-14726.
- Jyonouchi, H., Zhang, L., Gross, M., and Tomita, Y. (1994). Immunomodulating actions of carotenoids-enhancement of *in vivo* and *in-vitro* antibody-production to Tdependent antigens. **Nutrition and Cancer**. 21: 47-58.

- Kaewkumsan, P. (2009). **Extraction, stability and antioxidant activities of lutein from yellow silk cocoons of silkworm (*bombyx mori*)**. M.S. thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.
- Kamal-Eldin, A., and Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**. 31: 671-701.
- Kaskoos, R. A., Ali, M., and Naquvi, K. J. (2012). Phenyl alkyls and citronellyl glucosides from the silk cocoons of *Bombyx mori* L. **Der Pharmacia Lettre**. 4: 741-746.
- Kayser, H. (1975). Fatty-acid esters of lutein in *Pieris brassicae* fed on natural and artificial diets. **Insect Biochemistry**. 5: 861-875.
- Khachik, F. (1995). Process for isolation, purification, and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof. **United States Patent 5,382,714**.
- Khoo, H. E., Prasad, K. N., Kong, K. W., Jiang, Y. M., and Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. **Molecules**. 16: 1710-1738.
- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., and Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 6509-6515.
- Kim, D. O., Jeong, S. W., and Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**. 81: 321-326.
- Kim, H. W., Chew, B. P., Wong, T. S., Park, J. S., Weng, B. C., Byrne, K. M., Hayek, M. G., and Reinhart, G. A. (2000a). Dietary lutein stimulates immune response in the canine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 74: 315-327.
- Kim, H. W., Chew, B. P., Wong, T. S., Park, J. S., Weng, B. C., Byrne, K. M., Hayek, M. G., and Reinhart, G. A. (2000b). Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 73: 331-341.
- Kim, J. H., Na, H. J., Kim, C. K., Kim, J. Y., Ha, K. S., Lee, H., Chung, H. T., Kwon, H. J., Kwon, Y. G., and Kim, Y. M. (2008). The non-provitarnin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappa B-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3 kinase/PTEN/Akt and NF-kappa B-inducing kinase pathways: Role of H₂O₂ in NF-kappa B activation. **Free Radical Biology and Medicine**. 45: 885-896.

- Kurioka, A., and Yamazaki, M. (2002). Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (sasamayu) of the silkworm, *Bombyx mori*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 66: 1396-1399.
- Landrum, J. T., and Bone, R. A. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 385: 28-40.
- Lavecchia, R., and Zuorro, A. (2006). Shelf stability of lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flowers in vegetable oils. **Chemical Technology**. 80: 1-6.
- Lee, E. H., Faulhaber, D., Hanson, K. M., Ding, W., Peters, S., Kodali, S., and Granstein, R. D. (2004). Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression. **Journal of Investigative Dermatology**. 122: 510-517.
- Lee, W. J., and Choi, S. W. (2012). Quantitative Changes of Polyphenolic Compounds in Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves in relation to varieties, harvest period, and heat processing. **Preventive Nutrition and Food Science**. 17: 280-285.
- Li, D. J., Song, J. F., and Liu, C. Q. (2014). Kinetic stability of lutein in freeze-dried sweet corn powder stored under different conditions. **Food Science and Technology Research**. 20: 65-70.
- Li, L., Aldini, G., Carini, M., Chen, C. Y., Chun, H. K., Cho, S. M., Park, K. M., Correa, C. R., Russell, R. M., Blumberg, J. B., and Yeum, K. J. (2009). Characterisation, extraction efficiency, stability and antioxidant activity of phytonutrients in *Angelica keiskei*. **Food Chemistry**. 115: 227-232.
- Lin, C. H., and Chen, B. H. (2005). Stability of carotenoids in tomato juice during processing. **European Food Research and Technology**. 221: 274-280.
- Lin, C. H., and Chen, B. H. (2005). Stability of carotenoids in tomato juice during storage. **Food Chemistry**. 90: 837-846.
- Lindsay, D. G., and Astley, S. B. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants-EUROFEDA. **Molecular Aspects of Medicine**. 23: 1-38.
- Li, X. (2013). Solvent effect and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging. **Food Chemistry**. 141: 2083-2088.
- Macías-Sánchez M. D., Fernandez-Sevilla, J. M., Acien Fernández, F. G., Cerón García, M. C., and Molina Grima, E. (2010). Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**. 123: 928-935.

- Madhavi, D. L., and Kagan, D. I. (2002). Process for the isolation of mixed carotenoids from plants. **United States Patent 6.380.442**.
- Mares-Perlman, J. A., Millen, A. E., Ficek, T. L., and Hankinson, S. E. (2002). The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. **Overview Journal of Nutrition**. 132: 518-524.
- Materska, M. (2010). Evaluation of the lipophilicity and stability of phenolic compounds in herbal extracts. **Acta Scientiarum Polonorum. Technologiaalimentaria**. 9: 61-69.
- McGraw, K. J., and Ardia, D. R. (2003). Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: An experimental test. **The American Naturalist**. 162: 704-712.
- Mignone, L. I., Giovannucci, E., Newcomb, P. A., Titus-Ernstoff, L., Trentham-Dietz, A., Hampton, J. M., Willett, W. C., and Egan, K. M. (2009). Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer. **International Journal of Cancer**. 124: 2929-2937.
- Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**. 61: 141-146.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., and Rice-Evans, C. A. (1996). Activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS letters**. 384: 240-242.
- Mohan, S. C., Balamurugan, V., Salini, S. T., and Rekha, R. (2012). Metal ion chelating activity and hydrogen peroxide scavenging activity of medicinal plant *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 4: 197-202.
- Mortensen, A., and Skibsted, L. H. (1997). Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45: 2970-2977.
- Mortensen, A., and Skibsted, L. H. (1997). Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals: A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. **FEBS Letters**. 417: 261-266.
- Muller, L., and Bohm, V. (2011). Antioxidant activity of β -carotene compounds in different *in vitro* Assays. **Molecules**. 16: 1055-1069.
- Müller, L., Fröhlich, K., and Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. **Food Chemistry**. 129: 139-148.

- Muriach, M., Bosch-Morell, F., Alexander, G., Blomhoff, R., Barcia, J., Arnal, E., Almansa, I., Romero, F. J. and Miranda, M. (2006). Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. **Free Radical Biology and Medicine**. 41: 979-984.
- Newcomb, P. A., Klein, R., and Massoth, K. M. (1992). Education to increase ophthalmologic care in older onset diabetes patients: Indications from the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. **Journal of Diabetes and its Complications**. 6: 211-217.
- Palombo, P., Fabrizi, G., Ruocco, V., Ruocco, E., Fluhr, J., Roberts, R., and Morganti, P. (2007). Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: A double-blind, placebo-controlled study. **Skin Pharmacology and Physiology**. 20: 199-210.
- Pelucchi, C., Dal Maso, L., Montella, M., Parpinel, M., Negri, E., Talamini, R., Giudice, A., Franceschi, S., and La Vecchia, C. (2008). Dietary intake of carotenoids and retinol and endometrial cancer risk in an Italian case-control study. **Cancer Causes Control**. 19: 1209-1215.
- Pesek, C. A., and Warthesen, J. J. (1990). Kinetic model for photoisomerization and concomitant photodegradation of β -carotenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 38: 1313-1315.
- Peter Amala Sujith, A., Hymavathi, T. V., and Yasoda Devi, P. (2012). A comparative study of the hydrolysis of supercritical fluid extracted lutein esters by improved saponification and enzyme biocatalysis. **International Food Research Journal**. 19: 847-856.
- Petracek, F. J., and Zechmeister, L. (1954). Determination of partition coefficients of carotenoids as a tool in pigment analysis. **Analytical Chemistry**. 28: 1484-1485.
- Piljac-Žegarac, J., Stipčević, T., and Belščak, A. (2009). Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. **Journal of Apiprodukt and Apimedical Science**. 1: 43-50.
- Pongcharoen, S., Warnissorn, P., Lertkajornsinn, O., Limpeanchob, N., and Sutheerawattananonda, M. (2013). Protective effect of silk lutein on ultraviolet B-irradiated human keratinocytes. **Biological Research**. 46: 39-45.
- Prommuak, C., De-Eknamkul, W., and Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. **Separation and Purification Technology**. 62: 444-448.

- Promphet, P., Bunarsa, S., Sutheerawattananonda, M., and Kunthalert, D. (2014). Immune enhancement activities of silk lutein extract from *Bombyx mori* cocoons. **Biological Research**. 47: 15.
- Promphet, P., Bunarsa, S., Sutheerawattananonda, M., Kongbangkerd, A., and Kunthalert, D. (2013). Alteration of lymphocyte subpopulations in mice fed lutein from marigold extract. **Scientific Research and Essays**. 8: 22-25.
- Prince, M. R., LaMuraglia, G. M., and MacNichol, E. F. (1988). Increased preferential absorption in human atherosclerotic plaque with oral beta carotene. **Circulation**. 78: 338-344.
- Radojković, M. M., Zeković, Z. P., Vidović, S. S., Kočar, D. D., and Mašković, P. Z. (2012). Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., *Moraceae*) extracts. **Hemijska Industrija**. 66: 547-552.
- 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.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Mariotti, S., and Pokharel, G. (2008). Global magnitude of visual impairment caused by uncorrected refractive errors in 2004. **Bull World Health Organ**. 86: 63-70.
- Ribaya-Mercado, J. D., and Blumberg, J. B. (2004). Lutein and Zeaxanthin and Their Potential Roles in Disease Prevention. **Journal of the American College of Nutrition**. 23: 567-587.
- Richard, D., and Semba, M. D. (2007). **Handbook of nutrition and ophthalmology: Age-related macular degeneration**. Newjersey: Humana Press Inc.
- Roberts, R. L., Green, J., and Lewis, B. (2009). Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**. 27: 195-201.
- Rodriguez-Amaya, D. B. A., and Kimura, M. (2004). **Harvest plus handbook for carotenoid analysis**. Washington, DC: IFPRI and CIAT.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, DC.: ILSI Press.
- Rodriguez, G., Torres-Cardona, M. D., and Diaz, A. (2001). Purification of xanthophylls from marigold extracts that contain high levels of chlorophylls. **United States Patent 6.329.557**.

- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A., and Saura-Calixto, J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**. 20: 941-953.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., and Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**. 89: 569-575.
- Santocono, M., Zurria, M., Berrettini, M., Fedeli, D., and Falcioni, G. (2006). Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. 85: 205-215.
- Sasaki, M., Ozawa, Y., Kurihara, T., Kubota, S., Yuki, K., Noda, K., Kobayashi, S., Ishida, S., and Tsubota, K. (2010). Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. **Diabetologia**. 53: 971-979.
- Seddon, J. M., Ajani, U. A., and Sperduto, R. D. (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye disease case-control study group. **Journal of the American Medical Association**. 272: 1413-1420.
- Sergio, A. R., Paiva, M. D., Robert, M., and Russell, M. D. (1999). β -Carotene and Other carotenoids as antioxidants. **American College of Nutrition**. 5: 426-433.
- Shi, X. M., and Chen, F. (1997). Stability of lutein under various storage conditions. **Nahrung**. 41: 38-41.
- Sindhu, E. R., Preethi, K. C., and Kuttan, R. (2010). Antioxidant activity of carotenoid lutein *in vitro* and *in vivo*. **Indian Journal of Experimental Biology**. 48: 843-848.
- Siriamornpuna, S., Kaisoon, O., and Meesoc, N. (2012). Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, β -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. **Functional Food**. 4: 757-766.
- Sivel, M., Kracmar, S., Fisera, M., Klejdus, V., and Kuban, B. (2014). Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta* L.) concentrates used for production of food supplements. **Czech Journal of Food Sciences**. 32: 521-525.
- Sommerburg, O., Keunen, J. E. E., Bird, A. C., and van Kuijk, F. J. G. M. (1998). Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: The macular pigment in human eyes. **British Journal of Ophthalmology**. 82: 901-907.
- Song, L. L., Liang, R., Li, D. D., Xing, Y. D., Han, R. M., Zhang, J. P., and Skibsted, L. H. (2011). β -Carotene radical cation addition to green tea polyphenols. Mechanism of

- antioxidant antagonism in peroxidizing liposomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59: 12643-12651.
- Stahl, W., and Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans?. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 336: 1-9.
- Subagio, A., and Morita, N. (2001). No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein. **Food Research International**. 34: 315-320.
- Sundelin, S. P., and Nilsson, S. E. G. (2001). Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**. 31: 217-225.
- Sun, Z., and Yao, H. (2007). The influence of di-acetylation of the hydroxyl groups on the anti-tumor-proliferation activity of lutein and zeaxanthin. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. 1: 447-452.
- Sutheerawattananonda, M., Kaewkumsan, P., Limpeanchob, N., and Kanthalert, D. (2010). Method for extracting silk extract containing lutein. **WO 2012/091683 A1**.
- Tabunoki, H., Higurashi, S., Ninagi, O., Fujii, H., Banno, Y., Nozaki, M., Kitajima, M., Miura, N., Atsumi, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., and Sato, R. (2004). A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. **Federation of European Biochemical Societies**. 567: 175-178.
- Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Banno, Y., Jouni, Z. E., Kobayashi, M., Sato, R., Maekawa, H., and Tsuchida, K. (2002). Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. **Journal of Biological Chemistry**. 277: 32133-32140.
- Tamimi, R. M., Colditz, G. A., and Hankinson, S. E. (2009). Circulating carotenoids, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer. **Cancer Research**. 69: 9323-9329.
- Tang, Y. C., and Chen, B. H. (2000). Pigment change of freeze-dried carotenoid powder during storage. **Food Chemistry**. 69: 11-17.
- Tan, J. S., Wang, J. J., Flood, V., Rochtchina, E., Smith, W., and Mitchell, P. (2008). Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration the blue mountains eye study. **Ophthalmology**. 115: 334-341.

- Terra, W. R., Ferreira, C., De Bianchi, A. G., and Zinner, K. (1981). A violet carotenoprotein, containing echinenone, isolated from the haemolymph of the fly *Rhynchosciara americana*. **Physiology of Comparative Biochemistry**. 68: 89-93.
- Thomson, C. A., Stendell-Hollis, N. R., Rock, C. L., Cussler, E. C., Flatt, S. W., and Pierce, J. P. (2007). Plasma and dietary carotenoids are associated with reduced oxidative stress in women previously treated for breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**. 16: 2008-2015.
- Trieschmann, M., Van Kuijk, F. J. G. M., Alexander, R., Hermans, P., Luthert, P., Bird, A. C., and Pauleikhoff, D. (2008). Macular pigment in the human retina: Histological evaluation of localization and distribution. **Eye**. 22: 132-137.
- Tsao, R., Yang, R., Young, C. J., Zhu, H., and Manolis, T. (2004). Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1045: 65-70.
- Vaidya, B., and Choe, E. (2011). Stability of tocopherols and lutein in oil extracted from roasted or unroasted mustard seeds during the oil oxidation in the dark. **Food Science and Biotechnology**. 20: 193-199.
- Vicente, S. J. V., Queiroz, Y. S., Gotlieb, S. L. D., and Torres, E. A. F. S. (2010). Stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of regular and decaffeinated coffees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 57: 110-118.
- Wang, C., Baumgartner, R. N., Yang, D., Slattery, M. L., Murtaugh, M. A., Byers, T., Hines, L. M., Giuliano, A. R., and Baumgartner, K. B. (2009). No evidence of association between breast cancer risk and dietary carotenoids, retinols, vitamin C and tocopherols in Southwestern Hispanic and non-Hispanic White women. **Breast Cancer Research and Treatment**. 114: 137-145.
- Wang, D., Chen, J., Zhen, X., Qiao, X., and Huang, L. (2005). Disappearance of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on surfaces of pine [*Pinus thunbergii*] needles under irradiation of sunlight: Volatilization and photolysis. **Atmospheric Environment**. 39: 4583-4591.
- Wang, H. Y., Wang, Y. J., Zhou, L. X., Zhu, L., and Zhang, Y. Q. (2012). Isolation and bioactivities of a non-sericin component from cocoon shell silk sericin of the silkworm *Bombyx mori*. **Food and Function**. 3: 150-158.

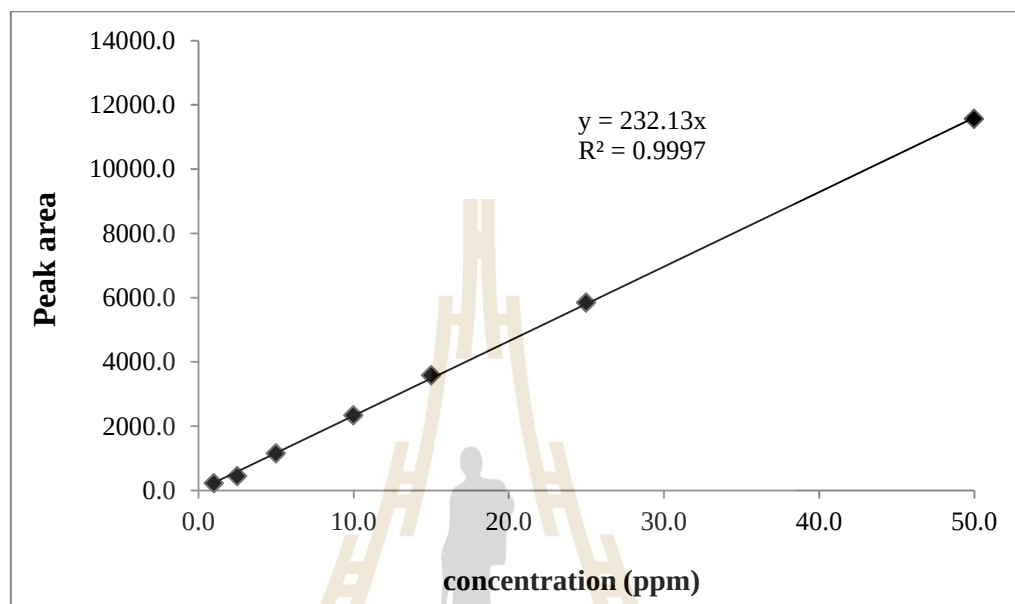
- Wang, M., Tsao, R., Zhang, S., Dong, Z., Yang, R., Gong, J., and Pei, Y. (2006). Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. **Food and Chemical Technology**. 44: 1522-1529.
- Waterhouse, A. L. (2005). Determination of total phenolics. **Handbook of Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons.
- Woodall, A. A., Lee, S. W. M., Weesie, R. J., Jackson, M. J., and Britton, G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1336: 33-42.
- Yemelyanov, A. Y., Katz, N. B., and Bernstein, P. S. (2001). Ligandbinding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. **Experimental Eye Research**. 72: 381-392.
- Yen, H. W., Chiang, W. C., and Sun, C. H. (2012). Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 43: 53-57.
- Young, A. J., and Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 385: 20-27.
- Zhao, Y. P., Li, M. W., Xu, A. Y., Hou, C. X., Li, M. H., Guo, Q. H., Huang, Y. P., and Guo, X. J. (2008). SSR based linkage and mapping analysis of C, a yellow cocoon gene in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Science**. 15: 399-404.
- Zou, Y., Liao, S., Shen, W., Liu, F., Tang, C., Chen, C. Y., and Sun, Y. (2012). Phenolics and antioxidant activity of mulberry leaves depend on cultivar and harvest month in Southern China. **International Journal of Molecular Sciences**. 13: 16544-16553.



ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. กราฟสารมาตรฐานลูทีนสำหรับหาปริมาณของลูทีนหลังการเก็บรักษา



ภาพที่ ผ1 กราฟสารมาตรฐานของลูทีน

ตารางที่ ผ1 ผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดจากรังไหมเหลือทิ้งที่ผ่านการทำแห้งและเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Strain	Time (Weeks)	Lutein concentration (ppm)						Retention of lutein (%)					
		-80°C	-20°C	4°C	40°C	25°C	25°C ⁺⁺	-80°C	-20°C	4°C	40°C	25°C	25°C
		(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Light)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Light)
Commercial lutein	0	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	28.660±1.964	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	8.396±0.532 ^b	7.977±0.330 ^b	3.270±0.184 ^c	2.803±0.203 ^c	10.231±1.032 ^a	5.231±0.772	29.30	27.83	11.41	9.78	84.62	18.25
	2	8.150±0.399 ^a	7.681±0.446 ^a	3.163±0.434 ^b	2.685±0.806 ^b	6.907±0.903 ^a	3.390±0.033	28.44	26.80	11.04	9.37	24.10	11.83
	4	7.174±1.120 ^a	7.595±0.065 ^a	3.121±0.197 ^c	0.723±0.176 ^d	3.849±3.451 ^b	1.005±0.090	25.03	26.50	10.89	2.52	13.43	3.51
	7	5.836±1.074 ^a	6.728±1.25 ^a	2.880±0.050 ^b	0.000±0.000 ^d	1.522±0.387 ^c	0.000±0.000	20.36	23.48	10.05	0.00	5.31	0.00
	19	4.897±1.800 ^a	5.328±1.528 ^a	2.650±0.437 ^b	0.000±0.000 ^c	1.176±0.057 ^{bc}	0.000±0.000	17.09	18.59	9.24	0.00	4.10	0.00
	48	4.206±1.071 ^a	4.222±1.093 ^a	2.245±0.178 ^b	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000	14.68	14.73	7.83	0.00	0.00	0.00
Nang Noi	0	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	27.854±0.666	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	14.639±0.371 ^a	12.747±0.392 ^{ab}	13.098±0.732 ^{ab}	1.890±1.154 ^c	12.093±2.016 ^b	6.398±0.581	52.56	45.76	47.02	6.78	43.42	22.97
	2	13.161±0.233 ^a	11.284±1.555 ^b	11.360±0.711 ^b	0.167±0.024 ^d	0.975±0.235 ^c	0.238±0.263	47.25	40.51	40.79	0.60	3.50	0.85
	4	12.963±0.023 ^a	11.119±1.396 ^b	11.318±0.328 ^b	0.000±0.000 ^c	0.265±0.231 ^c	0.000±0.000	46.54	39.92	40.63	0.00	0.95	0.00
	7	12.446±0.735 ^a	10.420±1.296 ^b	9.997±1.024 ^b	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000	44.68	37.41	35.89	0.00	0.00	0.00
	19	12.489±0.845 ^a	9.813±0.175 ^b	9.150±0.061 ^c	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000	44.84	35.23	32.85	0.00	0.00	0.00
	48	10.969±0.695 ^a	7.871±0.764 ^b	2.263±0.278 ^c	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000	39.38	28.26	8.13	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ ๗1 ผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดจากรังไหมเหลืองที่ผ่านการทำแห้งและเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)

Strain	Time (Weeks)	Lutein concentration (ppm)						Retention of lutein (%)					
		-80°C	-20°C	4°C	40°C	25°C	25°C ⁺⁺	-80°C	-20°C	4°C	40°C	25°C	25°C
		(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Light)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Light)
Nang Tui	0	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	33.607±2.491	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	15.653±0.882 ^{bc}	14.368±0.093 ^{bc}	16.261±0.927 ^b	4.309±0.663 ^d	22.086±1.382 ^a	12.156±3.603	46.58	42.75	48.39	12.82	65.72	36.17
	2	15.387±0.365 ^a	13.085±0.609 ^c	14.664±0.041 ^b	0.394±0.185 ^c	9.138±0.147 ^d	2.354±2.109	45.79	38.94	43.64	1.17	27.19	7.00
	4	15.362±0.011 ^a	13.454±0.564 ^b	13.798±0.377 ^b	0.065±0.113 ^d	3.681±1.046 ^c	0.343±0.298	45.71	40.04	41.06	0.19	10.95	1.02
	7	14.287±0.050 ^a	12.905±0.963 ^b	13.625±0.030 ^{ab}	0.000±0.000 ^c	0.332±0.222 ^c	0.000±0.000	42.51	38.40	40.54	0.00	0.99	0.00
	19	13.910±0.172 ^a	12.202±0.312 ^b	12.537±0.034 ^b	0.000±0.000 ^c	0.113±0.195 ^c	0.000±0.000	41.39	36.31	37.30	0.00	0.34	0.00
	48	13.788±0.332 ^a	11.598±0.564 ^b	8.249±0.266 ^c	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000	41.03	34.51	24.54	0.00	0.00	0.00
Nang Sew	0	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	29.676±0.728	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	15.347±0.255 ^b	14.333±0.465 ^c	13.289±0.513 ^d	0.698±0.335 ^c	19.049±0.230 ^a	15.317±1.252	51.71	48.30	44.78	2.35	64.19	51.61
	2	15.352±0.529 ^a	13.679±1.612 ^{ab}	13.053±0.364 ^b	0.176±0.026 ^d	10.437±2.064 ^c	1.581±1.616	51.73	46.10	43.99	0.59	35.17	5.33
	4	14.987±0.234 ^a	13.543±1.340 ^b	12.701±0.628 ^b	0.000±0.000 ^d	2.399±0.340 ^c	0.106±0.092	50.50	45.64	42.80	0.00	8.08	0.36
	7	13.614±0.142 ^a	13.143±0.271 ^b	12.079±0.374 ^c	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.076±0.132	45.88	44.29	40.70	0.00	0.00	0.26
	19	13.211±0.818 ^a	12.717±1.898 ^a	11.787±1.603 ^a	0.000±0.000 ^b	0.000±0.000 ^b	0.000±0.000	44.52	42.85	39.72	0.00	0.00	0.00
	48	12.448±0.763 ^a	11.242±1.738 ^a	5.463±0.092 ^b	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000	41.95	37.88	18.41	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ ๗1 ผลของอุณหภูมิและแสงสว่างต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลูทีนในสารสกัดจากรังไหมเหลืองที่ผ่านการทำแห้งและเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)

Strain	Time (Weeks)	Lutein concentration (ppm)						Retention of lutein (%)					
		-80°C	-20°C	4°C	40°C	25°C	25°C**	-80°C	-20°C	4°C	40°C	25°C	25°C
		(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Light)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Dark)	(Light)
Nang Lai	0	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	28.966±1.395	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	14.076±0.096 ^b	13.705±0.355 ^b	13.762±0.496 ^b	2.703±0.416 ^c	17.022±0.371 ^a	9.143±1.107	48.60	47.31	47.51	9.33	58.77	31.57
	2	13.530±0.343 ^a	12.875±0.235 ^{ab}	12.631±0.015 ^b	0.376±0.414 ^d	6.490±0.870 ^c	1.118±0.932	46.71	44.45	43.61	1.30	22.41	3.86
	4	13.110±0.115 ^a	12.587±1.328 ^a	12.305±1.091 ^a	0.036±0.063 ^c	2.012±1.114 ^b	0.064±0.111	45.26	43.46	42.48	0.12	6.95	0.22
	7	12.149±0.032 ^a	12.312±0.568 ^a	11.286±0.161 ^b	0.000±0.000 ^c	0.044±0.076 ^c	0.000±0.000	41.94	42.51	38.96	0.00	0.15	0.00
	19	12.308±0.333 ^a	11.994±0.457 ^a	10.749±0.844 ^b	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000	42.49	41.41	37.11	0.00	0.00	0.00
	48	11.662±0.221 ^a	10.563±0.521 ^b	8.882±1.037 ^c	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000 ^d	0.000±0.000	40.26	36.47	30.66	0.00	0.00	0.00
Samrong	0	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	28.456±1.404	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	15.344±0.325 ^a	14.343±1.007 ^a	14.049±0.606 ^a	9.129±1.430 ^b	7.331±2.826 ^b	1.010±0.236	53.92	50.41	49.37	32.08	25.76	3.55
	2	14.467±0.239 ^a	13.658±0.655 ^b	13.197±0.560 ^b	0.493±0.544 ^c	0.734±0.133 ^c	0.000±0.000	50.84	48.00	46.38	1.73	2.58	0.00
	4	13.772±1.394 ^a	12.763±0.363 ^a	12.770±0.758 ^a	0.000±0.000 ^b	0.265±0.230 ^b	0.000±0.000	48.40	44.85	44.87	0.00	0.93	0.00
	7	13.267±0.373 ^a	12.893±0.308 ^a	6.729±1.357 ^b	0.000±0.000 ^b	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000	46.62	45.31	23.65	0.00	0.00	0.00
	19	12.245±0.371 ^a	12.142±1.038 ^a	6.603±0.561 ^b	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000 ^c	0.000±0.000	43.03	42.67	23.20	0.00	0.00	0.00
	48	11.960±0.074 ^a	11.667±1.351 ^a	0.593±0.057 ^b	0.000±0.000 ^b	0.000±0.000 ^b	0.000±0.000	42.03	41.00	2.08	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

** หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยที่อุณหภูมิ 25°C (Dark) ($p<0.01$)

ตารางที่ ผ2 ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสในที่มืด

Temp (°C)	Time (Weeks)	Retention of lutein (%)					
		Commercial	Nang Noi	Nang Tui	Nang Sew	Nang Lai	Samrong
-80 (Dark)	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	29.30 ^c	52.56 ^a	46.58 ^b	51.71 ^a	48.60 ^b	53.92 ^a
	2	28.44 ^d	47.25 ^b	45.79 ^c	51.73 ^a	46.71 ^{bc}	50.84 ^a
	4	25.03 ^c	46.54 ^{ab}	45.71 ^b	50.50 ^a	45.26 ^b	48.40 ^{ab}
	7	20.36 ^c	44.68 ^a	42.51 ^b	45.88 ^a	41.94 ^b	46.62 ^a
	19	17.09 ^b	44.84 ^a	41.39 ^a	44.52 ^a	42.49 ^a	43.03 ^a
	48	14.68 ^b	39.38 ^a	41.03 ^a	41.95 ^a	40.26 ^a	42.03 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ ผ3 ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในที่มีด

Temp (°C)	Time (Weeks)	Retention of lutein (%)					
		Commercial	Nang Noi	Nang Tui	Nang Sew	Nang Lai	Samrong
-20 (Dark)	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	27.83 ^d	45.76 ^b	42.75 ^c	48.30 ^{ab}	47.31 ^b	50.41 ^a
	2	26.80 ^d	40.51 ^{bc}	38.94 ^c	46.10 ^{ab}	44.45 ^{abc}	48.00 ^a
	4	26.50 ^c	39.92 ^{ab}	40.04 ^b	45.64 ^a	43.46 ^{ab}	44.85 ^a
	7	23.48 ^d	37.41 ^{bc}	38.40 ^c	44.29 ^a	42.51 ^{ab}	45.31 ^a
	19	18.59 ^c	35.23 ^b	36.31 ^b	42.85 ^a	41.41 ^{ab}	42.67 ^a
	48	14.73 ^d	28.26 ^c	34.51 ^{bc}	37.88 ^{ab}	36.47 ^{ab}	41.00 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ตารางที่ ผ4 ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด

Temp (°C)	Time (Weeks)	Retention of lutein (%)					
		Commercial	Nang Noi	Nang Tui	Nang Sew	Nang Lai	Samrong
4 (Dark)	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	11.41 ^d	47.02 ^{ab}	48.39 ^{ab}	44.78 ^b	47.51 ^{ab}	49.37 ^a
	2	11.04 ^d	40.79 ^c	43.64 ^{bc}	43.99 ^b	43.61 ^{bc}	46.38 ^a
	4	10.89 ^c	40.63 ^b	41.06 ^b	42.80 ^{ab}	42.48 ^{ab}	44.87 ^a
	7	10.05 ^c	35.89 ^a	40.54 ^a	40.70 ^a	38.96 ^a	23.65 ^b
	19	9.24 ^d	32.85 ^{ab}	37.30 ^{ab}	39.72 ^a	37.11 ^{ab}	23.20 ^c
	48	7.83 ^d	8.13 ^d	24.54 ^b	18.41 ^c	30.66 ^a	2.08 ^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



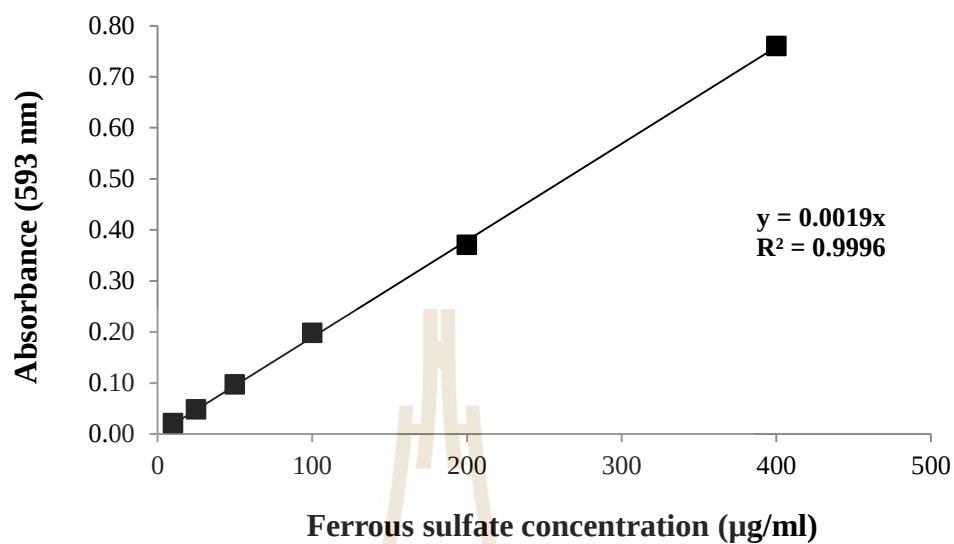
ตารางที่ ๕5 ร้อยละของปริมาณลูทีนที่คงอยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืด

Temp (°C)	Time (Weeks)	Retention of lutein (%)					
		Commercial	Nang Noi	Nang Tui	Nang Sew	Nang Lai	Samrong
25 (Dark)	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	1	84.6 ^a	43.42 ^c	65.72 ^b	64.19 ^b	58.77 ^b	25.76 ^d
	2	24.10 ^b	3.50 ^d	27.19 ^b	35.17 ^a	22.41 ^c	2.58 ^d
	4	13.43 ^a	0.95 ^c	10.95 ^b	8.08 ^b	6.95 ^b	0.93 ^c
	7	5.31 ^a	0.00 ^b	0.99 ^b	0.00 ^b	0.15 ^b	0.00 ^b
	19	4.10 ^a	0.00 ^b	0.34 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
	48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c}) หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

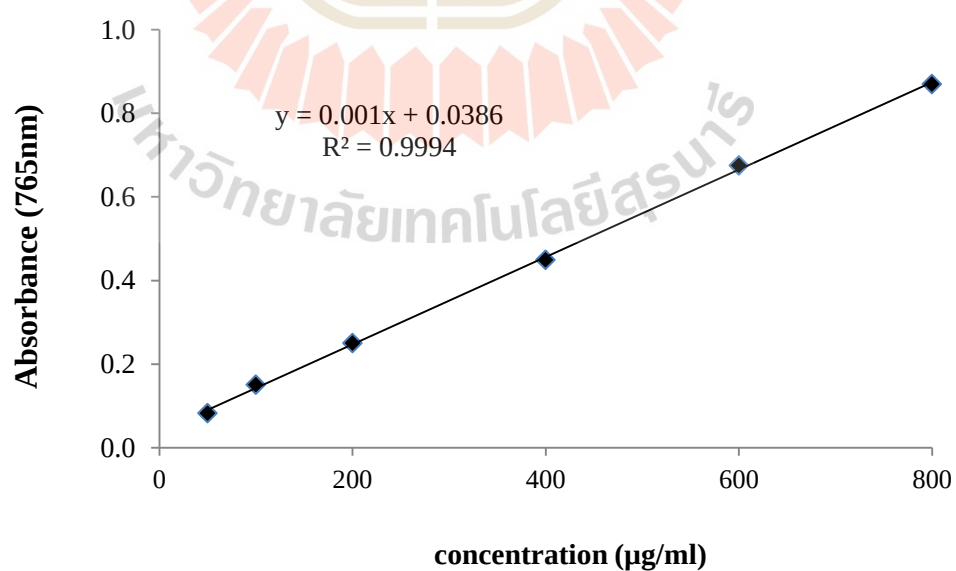


2. กราฟสารมาตรฐานเฟอร์รัส ซัลเฟตสำหรับค่า FRAP value



ภาพที่ ผ2 กราฟมาตรฐานเฟอร์รัส ซัลเฟต

3. สารมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด



ภาพที่ ผ3 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

ประวัติผู้เขียน

นางสาววารี มະนุกา เกิดเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2528 ศึกษาในระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนปลายนาวิทยา และศึกษาต่อในระดับมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนพงษ์สวัสดิ์วิทยานุกเคราะห์ จบการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนอรุโณทัย จังหวัดลำปาง จากนั้นในปีการศึกษา 2547 ได้รับการคัดเลือกประเภทโควตาให้ศึกษาต่อในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนเรศวร และสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ในปีการศึกษา 2550 ต่อจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2553 โดยขณะศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาอาหารที่เป็นยาและผลิตภัณฑ์ยาจากถั่วที่สกัดได้จากงาไหมเหลืองและอนุพันธ์ขนาดเล็กของโปรตีนซีรีซิน และโครงการวิจัยเรื่องการผลิตไหมครบวงจรแบบไม่เบียดเบียนสำหรับอาหารเสริมและเครื่องสำอาง

