

การเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของ
กวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) ด้วยเอทีฟอน
และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดง

นางสาวจุฬาลักษณ์ ทวีบุตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2551

**INCREASING ACCUMULATION OF ANTHOCYANIN
IN THE TUBEROUS ROOTS OF RED KWAO KRUA
[*Butea superba* Roxb.] BY ETHEPHON AND THE
ANTIOXIDANT CAPACITY OF RED KWAO KRUA
CRUDE EXTRACT**

Chulalak Thawibut

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Master of Science in Crop Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2008

การเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง (*Butea superba* Roxb.)

ด้วยเอทีฟอน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดง

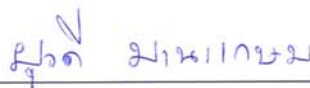
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



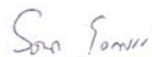
(อ. ดร.สุดชด วุ่นประเสริฐ)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร.ยวดี มานะเกษม)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



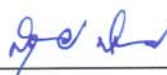
(ผศ. ดร.รจนา โอภาสศิริ)

กรรมการ



(ศ. ดร.ไพโรจน์ สัตยธรรม)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ



(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จุพาลักษณ์ ทวีบุตร : การเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) ด้วยเอทีฟอน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดง [INCREASING ACCUMULATION OF ANTHOCYANIN IN THE TUBEROUS ROOTS OF RED KWAO KRUA (*Butea superba* Roxb.) BY ETHEPHON AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF RED KWAO KRUA CRUDE EXTRACT] อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.ยวดี มานะเกษม, 74 หน้า

รากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) มีแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เพื่อเป็นแนวทางการปลูกกวาวเครือแดงให้มีแอนโทไซยานินสูง และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดง ได้ทำการทดลอง 2 การทดลองในปี 2550-2551 ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี การทดลองที่ 1 การเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงด้วยเอทีฟอน วางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ 5 ทรีตเมนต์ คือ ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 0 (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น), 100, 200, 300 และ 400 ppm ตามลำดับ ให้กวาวเครือแดง ผลการทดลองพบว่า การฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก และน้ำหนักสดของรากของกวาวเครือแดงแตกต่างกันทางสถิติ การฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้มีความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากและปริมาณแอนโทไซยานินในรากมากที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การทดลองที่ 2 ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดง ซึ่งใช้สารสกัดกวาวเครือแดงจากการทดลองที่ 1 จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า IC_{50} ของการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดทั้ง 5 ทรีตเมนต์ พบว่า ค่า IC_{50} มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สารสกัดกวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า IC_{50} จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 5 ทรีตเมนต์เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ trolox โดยใช้ independent sample t-test พบว่า สารสกัดกวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ trolox และได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวาวเครือแดง โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของ lag time ของสารสกัดทั้ง 5 ทรีตเมนต์ พบว่า lag time แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยสารสกัดกวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้นานที่สุด และจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของ lag time ของสารสกัดกวาวเครือแดง 5 ทรีตเมนต์ และ trolox เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัดกวาวเครือแดง) โดยวิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทรีตเมนต์ และ trolox มีฤทธิ์

ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้นานกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดังนั้น การฉีดพ่นเอทีฟอนให้กวางเครือแดงสามารถเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงได้ และสารสกัดกวางเครือแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา จุฬาลักษณ์ ทวีบุตร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศุภัส วัฒนกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สมาน ธรรม

CHULALAK THAWIBUT : INCREASING ACCUMULATION OF
ANTHOCYANIN IN THE TUBEROUS ROOTS OF RED KWAO KRUA
(*Butea superba* Roxb.) BY ETHEPHON AND THE ANTIOXIDANT
CAPACITY OF RED KWAO KRUA CRUDE EXTRACT. THESIS
ADVISOR : ASST. PROF. YUVADEE MANAKASEM., Ph.D.,74 PP.

Butea superba Roxb./ ETHEPHON/ ANTHOCYANIN/ ANTIOXIDANT/ LDL

Red Kwao Krua (*Butea superba* Roxb.) has anthocyanin in the tuberous roots. Anthocyanin is an antioxidant, which is beneficial for health. This study aimed to increase anthocyanin in the tuberous roots of Red Kwao Krua (RKK) and investigated the antioxidant capacity of RKK crude extract. Two experiments were conducted during 2007-2008 at Suranaree University of Technology. The first experiment studied the effect of ethephon on the accumulation of anthocyanin in the tuberous roots of RKK. The experiment was a RCBD with 3 replications and 5 treatments of ethephon concentration levels. RKK were sprayed with ethephon at concentrations of 0 (distilled water), 100, 200, 300 and 400 ppm. The results showed that none of the ethephon concentrations had a statistically significant effect on the diameter, length and fresh weight of the tuberous roots or the diameter of the stem. However, the ethephon concentration had a highly significant effect on the thickness of cortex and the amount of anthocyanin in the tuberous roots. Ethephon at concentrations of 300 and 400 ppm gave the highest thickness of cortex and amount of anthocyanin. The second experiment studied the antioxidant capacity of RKK crude extract using DPPH, ABTS and the inhibition of LDL oxidation techniques in comparison with

standard trolox. The DPPH and ABTS techniques showed that every concentration of ethephon used resulted in highly significant differences in the IC_{50} value. The RKK crude extract after spraying with ethephon at concentrations of 300 and 400 ppm gave the lowest IC_{50} value. The comparison between the IC_{50} of the crude extract with the IC_{50} value of trolox was analyzed by the independent sample t-test. The RKK crude extract after spraying with ethephon at the concentrations of 300 and 400 ppm had no statistically significant difference to trolox. The comparison of the lag time of the RKK crude extract, trolox, and control (without RKK crude extract added) by the independent sample t-test showed that the RKK crude extract, and trolox had highly significantly different lag times to the control. Therefore, spraying the RKK with ethephon can increase the accumulation of anthocyanin in the tuberous roots, and the RKK crude extract had antioxidant characteristics.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2008

Student's Signature Ci Thani but

Advisor's Signature Yuwadee Manakasem

Co-advisor's Signature Rodjane Grassin

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลต่าง ๆ ที่ได้ช่วยเหลือและสนับสนุนให้การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ผศ.ดร.ยุวดี มานะเกษม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.รจนา โอภาสศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาทางด้านวิชาการและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

อาจารย์ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่านที่ช่วยให้คำปรึกษาทางด้านวิชาการ

คุณนวลปรานค์ อุทัยดา และคุณสมยศ พิมพ์พร เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือและจัดเตรียมอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณเป็นพิเศษ คุณสุพินญา บุญมานพ คุณเกษร เมืองทิพย์ คุณบุญธรรม คิดคำ คุณจรรุจินันท์ หล้ากวนวัน คุณวิโรจน์ เชาววิเศษ คุณชัยวัฒน์ ใจวังเย็น และผู้มีน้ำใจทุกท่านที่ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ที่ทำให้การปฏิบัติงานเป็นไปได้ด้วยดี

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวทวิบุตร ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อ รวมถึงเป็นที่ปรึกษาและคอยให้กำลังใจที่ดีเสมอมา ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษา และการดำเนินชีวิตตลอดมา

จุฬาลักษณ์ ทวิบุตร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้.....	3
1.6 รายการอ้างอิง.....	3

2 ปรีक्षणวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปของกวาวเครือแดง.....	5
2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง.....	6
2.3 แอนโทไซยานิน.....	7
2.3.1 การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	8
2.4 แอนโทไซยานินกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ.....	9
2.4.1 อนุมูลอิสระ.....	9
2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	10
2.5 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	11
2.5.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay.....	12
2.5.2 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radical decolorization assay.....	13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.3	ฤทธิ์การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL).....	14
2.5.3.1	คอเรสเตอรอล.....	14
2.3.5.2	ฤทธิ์การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ.....	14
2.6	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต.....	15
2.6.1	อิทธิพลของเอทีฟอน.....	15
2.7	รายการอ้างอิง.....	16
บทที่		
3	การศึกษาอิทธิพลของเอทีฟอนต่อการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง (<i>Butea superba</i> Roxb.)	
	บทคัดย่อ.....	23
3.1	บทนำ.....	23
3.2	วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.2.1	สถานที่ทำการวิจัย.....	24
3.2.2	แผนการทดลองการให้เอทีฟอน.....	25
3.2.3	การศึกษาการเจริญเติบโตของกวาวเครือแดง.....	25
3.2.4	การตรวจสอบปริมาณแอนโทไซยานิน.....	27
3.2.5	การวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
3.3	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	29
3.3.1	การเจริญเติบโตของลำต้นและรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง.....	29
3.3.2	ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง.....	32
3.4	สรุปผลการวิจัย.....	35
3.5	รายการอ้างอิง.....	36
4	การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง (<i>Butea supraerba</i> Roxb.)	
	บทคัดย่อ.....	40

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1	บทนำ.....	41
4.2	วิธีดำเนินการวิจัย.....	42
4.2.1	สถานที่ทำการวิจัย.....	42
4.2.2	กลุ่มตัวอย่าง วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง.....	43
4.2.3	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay.....	43
4.2.4	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS free radical decolorization assay.....	44
4.2.5	การวัดฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความ หนาแน่นต่ำในหลอดทดลอง.....	44
4.2.6	การวิเคราะห์ข้อมูล.....	45
4.3	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	45
4.3.1	ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay.....	45
4.3.2	ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS free radical decolorization assay.....	47
4.3.3	ผลการวัดฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความ หนาแน่นต่ำในหลอดทดลอง.....	49
4.4	สรุปผลการวิจัย.....	52
4.5	รายการอ้างอิง.....	53
5	บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	57
5.1	การเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง (<i>Butea superba</i> Roxb.) ด้วยเอทีฟอน.....	57
5.1.1	การเจริญเติบโตทางลำต้นและรากของกวางเครือแดง.....	57
5.1.2	ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง.....	57
5.2	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดง (<i>Butea superba</i> Roxb.).....	57
5.2.1	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี ABTS free radical decolorization assay.....	57

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2.2	การวัดฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำในหลอดทดลอง.....	58
5.3	ข้อเสนอแนะ.....	58
5.3.1	การฉีดพ่นเอทีฟอน.....	58
5.3.2	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดง.....	58
ภาคผนวก	59
ประวัติผู้เขียน	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แอนโทไซยานินชนิดต่างๆที่เกิดจากการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทิล ในตำแหน่ง R-.....	8
4.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของ trolox กับสารสกัดกวางเครือแดง 5 ตรีตเมนต์ จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	46
4.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของ trolox กับสารสกัดกวางเครือแดง 5 ตรีตเมนต์ จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	48
4.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ lag time ของการใช้สารสกัดกวางเครือแดง และ trolox กับกลุ่มควบคุมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation.....	50
ตารางภาคผนวกที่	
1 ANOVA ของเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก และความยาวราก สะสมอาหารของกวางเครือแดง.....	60
2 ANOVA ของน้ำหนักสด ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ และปริมาณแอนโทไซยานิน ในรากสะสมอาหารกวางเครือแดง.....	60
3 ผลของเอทีฟอนต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นกวางเครือแดง และเส้นผ่านศูนย์กลาง รากสะสมอาหารของกวางเครือแดง.....	61
4 ผลของเอทีฟอนต่อความยาวราก และน้ำหนักสดของรากสะสมอาหารของ กวางเครือแดง.....	61
5 ผลของเอทีฟอนต่อความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ และปริมาณแอนโทไซยานิน ในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง.....	62
6 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงด้วยวิธี DPPH.....	62
7 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงด้วยวิธี ABTS.....	63
8 ANOVA ของค่า IC_{50} จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี ABTS และ lag time ของการวัดฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัด กวางเครือแดงทั้ง 5 ตรีตเมนต์.....	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
9 ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และการวัดฤทธิ์ยับยั้ง การเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวางเครือแดง และ trolox.....	64
10 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา LDL oxidation ที่เติมสารสกัดกวางเครือแดง 5 ทริตเมนต์ (T1-T5) และ trolox และปฏิกิริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมสาร สกัดกวางเครือแดง (control).....	64

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของต้นกวาวเครือแดง.....	6
2.2 สูตรโครงสร้างของแอนโทไซยานิน.....	8
2.3 วิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	9
2.4 สูตรโครงสร้างของ DPPH.....	13
2.5 สูตรโครงสร้างของ ABTS.....	13
2.6 สูตรโครงสร้างของเอทีฟอน.....	16
3.1 แผนผังแปลงปลูกกวาวเครือแดง ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.....	26
3.2 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดแอนโทไซยานินจากรากสะสมอาหารของ กวาวเครือแดง.....	27
3.3 เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของกวาวเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์.....	30
3.4 เส้นผ่านศูนย์กลางรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์.....	30
3.5 ความยาวรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์.....	31
3.6 น้ำหนักสดรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์.....	31
3.7 ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารกวาวเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์.....	32
3.8 ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์.....	33
4.1 ปฏิกริยา LDL oxidation แบ่งเป็น 3 ระยะ.....	42
4.2 ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของสารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทรีตเมนต์ของการวัดฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	46
4.3 ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของสารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทรีตเมนต์ของการวัดฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	49
4.4 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกริยา LDL oxidation.....	49
4.5 แสดงการเกิดปฏิกริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมสารสกัดกวาวเครือแดง เติมสารสกัด กวาวเครือแดงทั้ง 5 ทรีตเมนต์ และ trolox (control) ที่เวลา 0 ถึง 100 นาที.....	51
4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย lag time ของสารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทรีตเมนต์.....	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 ค่า R_f ของสารสกัดแอนโทไซยานินบนแผ่น โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง.....	65
2 การเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดแอนโทไซยานินจากรากสะสมอาหารของ กวางเครือแดงที่ pH 1-14.....	65
3 สเปกตรัมของสารสกัดกวางเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบที่ 510 nm.....	66
4 สเปกตรัมของสารสกัดกวางเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบที่ pH 1 และ 4.5.....	66
5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 0 ppm.....	67
6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 100 ppm.....	67
7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 200 ppm.....	68
8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 300 ppm.....	68
9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 400 ppm.....	69
10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของ trolox.....	69
11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 0 ppm.....	70
12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 100 ppm.....	70
13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 200 ppm.....	71
14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 300 ppm.....	71
15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน ความเข้มข้น 400 ppm.....	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
16	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของ trolox.....72
17	สูตรโครงสร้างของ trolox.....73
18	วิธีหา lag time จากจุดตัดของเส้นสัมผัสของ lag phase และ เส้นสัมผัสของ propagation phase.....73

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กวางเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรไทย หนึ่งในสี่ชนิดของกวางเครือคือ กวางเครือขาว กวางเครือแดง กวางเครือมอ และกวางเครือดำ (นิสากร ปานประสงค์, 2542) กวางเครือแดงมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด เกษร เมืองทิพย์ (2549) รายงานว่ารากสะสมอาหารของกวางเครือแดงมีแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถกระตุ้นให้ผมดกดำ ช่วยขยายหลอดเลือด ช่วยชะลอความเสื่อมของดวงตา ชะลอความเสื่อมของเซลล์ ลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ป้องกันโรคเบาหวาน และป้องกันโรคมะเร็งได้ (Donald and Cristobal, 2001)

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสาร หรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpair electron) อยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำลายเซลล์ และก่อให้เกิดการเสื่อมของอวัยวะส่วนต่าง ๆ และทำให้เสียสมดุลในร่างกาย ส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคความดันสูง โรคมะเร็ง โรคไต รวมถึงโรคที่เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ เช่น โรคอัลไซเมอร์ และสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ (Wang *et al.*, 1996; Sawa *et al.*, 1999; Shrikhande, 2000; Rodrigo and Rivera, 2002; Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999) ในปัจจุบัน มนุษย์ป่วยด้วยโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น การบริโภคหรือใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยป้องกัน และลดโอกาสการเกิดโรคได้ (เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุด, 2547)

วิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น DPPH radical scavenging assay, ABTS free radical decolorization assay, Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) และ Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) เป็นต้น แอนโทไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์ และมีแนวโน้มนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกัน และรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้ เพื่อเป็นการเพิ่มคุณภาพของกวางเครือแดง ได้มีแนวคิดเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง จากการตรวจ

เอกสารงานวิจัยต่างๆ พบว่า เอทีฟอนสามารถเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในพืชหลายชนิดได้ เช่น การใช้เอทีฟอนความเข้มข้น 400 ppm สามารถเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในมะม่วงพันธุ์มหาชนก (ชนาภรณ์ ศรีศิริพันธุ์ และคณะ, 2549) 100 ppm ในแอปเปิล (Li *et al.*, 2002) และ 100 ppm ใน บลูเบอร์รี่พันธุ์ 'Rabbiteye' (Ban *et al.*, 2006)

การศึกษานี้มุ่งศึกษาอิทธิพลของเอทีฟอนต่อการสะสมแอนโทไซยานิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดง เพื่อเป็นแนวทางเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงให้สูงขึ้น และข้อมูลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงจะเป็นพื้นฐานความรู้ที่สามารถนำไปศึกษาในขั้นสูง และเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องในการบำบัด และรักษาโรคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 ศึกษาอิทธิพลของเอทีฟอนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

1.2.2 ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบ

1.2.3 ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนารากสะสมอาหารของกวางเครือแดงมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรและเภสัชวิทยา และเพื่อส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

อิทธิพลของเอทีฟอนต่อการสะสมแอนโทไซยานินในแปลงปลูก และการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ข้อมูลอิทธิพลของเอทีฟอนที่มีต่อการเจริญเติบโต และการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

1.4.2 ได้แนวทางในการเพาะปลูกกวางเครือแดงที่ให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูง

1.4.3 ได้ข้อมูลพื้นฐานของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาในขั้นสูงต่อไป และเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องในการบำบัด และรักษาโรคต่อไป

1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1.5.1 หน่วยงานราชการและสถาบันการศึกษาที่ศึกษาเกี่ยวกับกวางเครือแดง
- 1.5.2 ผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรม เกษษกรรรม ผู้ประกอบโรคศิลปะ สาขาการแพทย์แผนไทยและหมอพื้นบ้าน
- 1.5.3 บริษัทเอกชนที่ประกอบกิจการเกี่ยวกับกวางเครือแดง
- 1.5.4 เกษตรกรและประชาชนทั่วไป

1.6 รายการอ้างอิง

- เกษร เมืองทิพย์. (2549). พฤกษศาสตร์ พันธุ์ การเจริญเติบโต และการพัฒนาการติดฝักและเมล็ด และแอนโทไซยานินในกวางเครือแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุด. (2547). การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกระชายดำและน้ำมันกึ่งภาพที่สกัดจากกระชายดำ [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_R10003-47.pdf
- เต็ม สมิตินันท์. (2523). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ. 379 หน้า.
- ธนาภรณ์ ศรีศิริพันธุ์ และคณะ. (2549). ผลของเอทีฟอนและกรดแอบไซซิกต่อปริมาณของแอนโทไซยานินและเอกทิวิตีของพินิลอะลานีนแอมโมเนีย-ไลเอส ในเปลือกผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 37(5): 156-159.
- นิสากร ปานประสงค์. (2542). กวางเครือ ความหวังสมุนไพรไทย. วารสาร UPDATE กันยายน-ตุลาคม. หน้า 40-45.
- สิทธิศักดิ์ ปิ่นมงคลกุล. (2545). การเปรียบเทียบผลของกวางเครือแดง (*Betea superba* Roxb.) ที่พบในพื้นที่ที่แตกต่างกันสองพื้นที่ ต่ออวัยวะสืบพันธุ์ พฤติกรรมการสืบพันธุ์ และการแข็งตัวของอวัยวะเพศในหนูขาวเพศผู้ (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2537). พฤกษศาสตร์. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว . 277 หน้า.
- สมพร ภูติยานันท์. (2542). ตรวจสอบเอกลักษณ์พืชสมุนไพร: ภาคพิเศษ. องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพฯ. 991 หน้า.
- โสภณ เริงสำราญ และคณะ. (2543). ฟลาโวนอยด์ และฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จากกวางเครือแดง

และฤทธิ์ต่อต้านไซคลิกเอเอ็มพีฟอสโฟไดเอสเทอร์. **วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**. 25(1): 169-176.

อิพิงษ์ มานะเสถียร. (2544). การศึกษาเปรียบเทียบผลของกวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) ที่พบในพื้นที่ที่แตกต่างกันสองแห่ง ต่อ หัวใจ ตับ ไต ต่อมหมวกไต และองค์ประกอบของเลือดในหนูขาวเพศผู้ (*Rattus norvegicus*). **วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสังแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี**.

Ban, T., Kugishima, M., Ogata, T., Shiozak, S., Horiuchi, S. and Ueda, H. (2006). **Effect of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on the fruit ripening characters of rabbiteye blueberry** [On-line]. Available: <http://www.sciencedirect.com>.

Donald, R.B. and Miranda, C. (2001). Antioxidant activity of flavonoids. Seminar Series, January. 2 (2): 1-3. Oregon State University, USA.

Li, Z.H., Sugaya, S., Gemma, H. and Iwahori, S. (2002). Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus-calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis. **Scientia Horticulture**. 11(94): 193-199.

Rodrigo, R. and Rivera, G. (2002). Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Rad. Biol. Med.** (33): 409-422.

Saint-Cricq de Gaulejac, N. Glories, Y. and Vivas, N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Res. Int.** 3(32): 327-333.

Sawa, T. Nakao, M. Akaike, T. Ono, K. and Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the antitumor-promoter effect of vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 5(47): 397-402.

Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. **Food Res. Int.** 12(33): 469-474.

Wang, H. Cao, G. and Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.** 10(44): 701-705.

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กวาวเครือแดง เป็นพืชที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Butea superba* Roxb. เป็นพืชตระกูลถั่ว (family: leguminosae) และอยู่ในวงศ์ พาปิลิโอนอยดี (sub-family: papilionoideae) ชื่อท้องถิ่นในแต่ละพื้นที่เรียกแตกต่างกัน เช่น ภาคกลางเรียก ทองเครือ ท้องถิ่นภาคเหนือ เรียกกวาวเครือ ท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียก จานเครือ (จระศักดิ์ กิรติคุณากร และไพฑูรย์ พิศุทธิ์สินธุ์, 2543) ดานจอมทอง (ชุมพร) โพทะกุ หรือ โปะตะกุ (กะเหรี่ยงกาญจน์) โพมือ (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน) (เต็ม สมิตินันท์, 2538; ขวลิขิต นิยมธรรม, 2538; วุฒิ ธรรมเวช, 2540)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

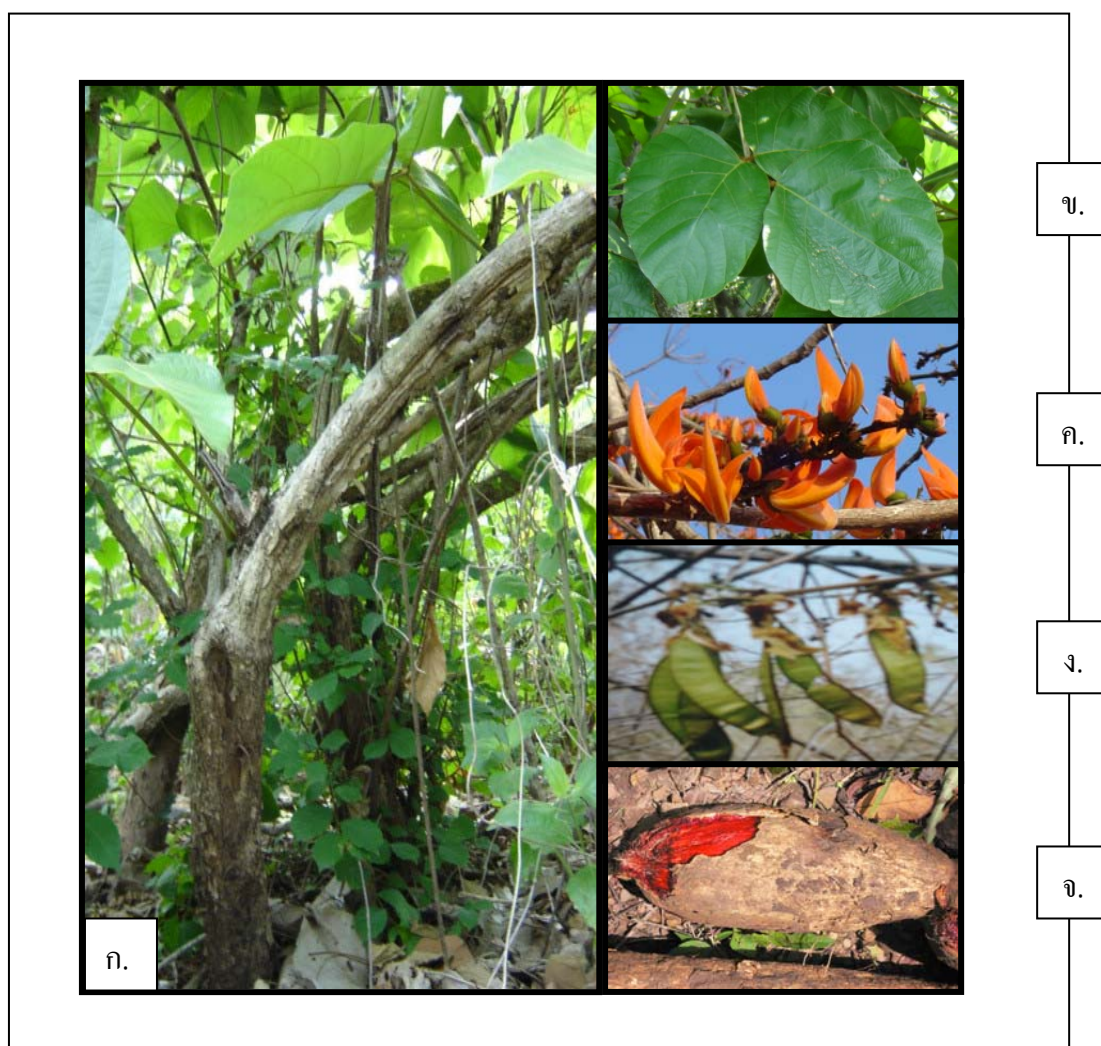
2.1.1 ลำต้น (ภาพที่ 2.1ก.) กวาวเครือแดง เป็นไม้เถาขึ้นต้นขนาดใหญ่ ในธรรมชาติลำต้นจะเลื้อยพันต้นไม้อื่น เนื้อไม้แข็ง เป็นไม้ผลัดใบ ในสภาพกลางแจ้งลำต้นค่อนข้างตรงและเป็นพุ่มแทนการเลื้อยพัน (ขวลิขิต นิยมธรรม, 2538; วุฒิ ธรรมเวช, 2540; ภวานา อัสวประภา, 2545)

2.1.2 ใบ (ภาพที่ 2.1ข.) เป็นใบประกอบแบบฝ่ามือ (palmately compound leaf) ชนิดมีใบย่อยสามใบ (trifoliate leaf) ใบกลางมีปลายใบโค้งมน โคนใบเรียว ผิวใบด้านบนเรียบ ด้านล่างของใบมีขนอ่อนสั้นๆ ใบย่อยมีลักษณะเป็นรูปไข่ ใบแข็งและหนา (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2537; ขวลิขิต นิยมธรรม, 2538; สมพร ภูติยานันท์, 2542)

2.1.3 ดอก (ภาพที่ 2.1ค.) เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower or bisexual flower) มีช่อดอกเป็นแบบอินดิเทอร์มินาท (indeterminate inflorescence) ชนิดราซิม (raceme) เกิดจากตาโคนใบที่ร่วงแล้ว ก้านดอกย่อยมีขนหนา ดอกที่อยู่ด้านล่างสุดจะบาน และแก่ก่อนดอกที่อยู่เหนือขึ้นไป ดอกมีลักษณะคล้ายดอกแค มีสีส้มทอง ดอกของกวาวเครือแดงจะออกตามซอกกิ่งในระยะผลัดใบ (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2537; ขวลิขิต นิยมธรรม, 2538; สมพร ภูติยานันท์, 2542; วุฒิ ธรรมเวช, 2540)

2.1.4 ฝัก (ภาพที่ 2.1ง.) ฝักมีลักษณะแบน ฝักที่ยังอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาล แต่ละฝักมีเมล็ดสมบูรณ์ 1 เมล็ด (อรดี สหวัชรินทร์, 2542; สิทธิศักดิ์ ปิ่นมงคลกุล, 2545)

2.1.5 ราก (ภาพที่ 2.1จ.) เป็นรากสะสมอาหาร (tuberous root) มีลักษณะเรียวยาวคล้ายหัวมันสำปะหลัง เมื่อเกิดบาดแผลจะมียางสีแดงคล้ายเลือดซึมออกมา (ขวลิขิต นิยมธรรม, 2538; โสภณ เรืองสำราญ และคณะ, 2543; สิทธิศักดิ์ ปิ่นมงคลกุล, 2544)



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของกาวเครือแดง ก. ต้นกาวเครือแดง ข. ใบกาวเครือแดง ค. ดอกกาวเครือแดง ง. ฟักกาวเครือแดง และ จ. รากสะสมอาหารกาวเครือแดง

2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในรากสะสมอาหาร (tuberous root) ของกาวเครือแดง

ชนาธิป รักศิลป์ (2538) พบว่า รากของกาวเครือแดงที่นำมาจากจังหวัดลำปางมีองค์ประกอบทางเคมีของสาร 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กรดอินทรีย์ชนิดโซ่ตรง (carboxylic acid) ได้แก่

- (1) decosanoic acid สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{44}O_2$
- (2) tricosanoic acid สูตรโมเลกุล $C_{23}H_{46}O_2$
- (3) tetracosanoic acid สูตรโมเลกุล $C_{24}H_{48}O_2$
- (4) pentacosanoic acid สูตรโมเลกุล $C_{25}H_{50}O_2$
- (5) hexacosanoic acid สูตรโมเลกุล $C_{26}H_{52}O_2$

กลุ่มที่ 2 สารกลุ่มไขมันพืช (phytosterols) ได้แก่

- (1) β -sitosterol
- (2) campesterol
- (3) stigmasterol

กลุ่มที่ 3 สเตอรอลไกลโคไซด์ (sterolglycosides) ได้แก่

- (1) β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside
- (2) stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside

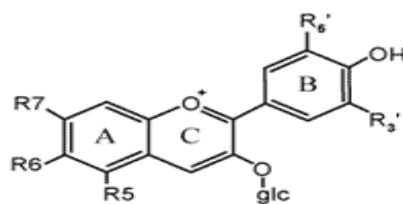
กลุ่มที่ 4 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ได้แก่

- (1) 3,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone
- (2) 3,3'-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside
- (3) anthocyanin

เกษร เมืองทิพย์ (2549) ตั้งสมมติฐานว่ายางสีแดงที่พบบริเวณเปลือกของรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงอาจจะเป็นแอนโทไซยานิน และได้ทำการทดสอบสมมติฐาน พบว่ามีคุณสมบัติตรงกับแอนโทไซยานิน จึงเป็นอีกหนึ่งเหตุผลที่สนับสนุนว่าในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงมีแอนโทไซยานิน

2.3 แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานินจัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ (flavonoid) พบในผัก ผลไม้ และดอกไม้ เช่น ในกะหล่ำปลีสีม่วง กระจับแดง องุ่นแดง และดอกอัญชัน แอนโทไซยานินมีสูตรโครงสร้างตามที่แสดงในภาพที่ 2.2 การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทิลในตำแหน่ง R- ทำให้เกิด แอนโทไซยานินชนิดที่แตกต่างกันไป แอนโทไซยานินพบมากในธรรมชาติในรูปไกลโคไซด์ (glycoside) ซึ่งจับน้ำตาลด้วยพันธะไกลโคซิดิกหรือเรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) มี 6 กลุ่ม คือ cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin และ petunidin (Mazza and Maniati, 1993) แอนโทไซยานินมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 510-540 nm สามารถละลายน้ำได้ มีสีช่วงสีแดงถึงสีน้ำเงิน สารละลายแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนแปลงสีตามค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เมื่อ pH ต่ำจะมีสีแดง pH ปานกลางจะมีสีน้ำเงิน ม่วง และเมื่อ pH สูงจะมีสีเหลืองซีด (Mazza and Maniati, 1993; เกษร เมืองทิพย์, 2550) แอนโทไซยานินทำให้ดอกไม้มีสีสันสวยงามเพื่อใช้ล่อแมลงมาผสมเกสรซึ่งเป็นการช่วยขยายพันธุ์พืช และช่วยป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ให้แก่พืชได้ (Harborne, 1986)



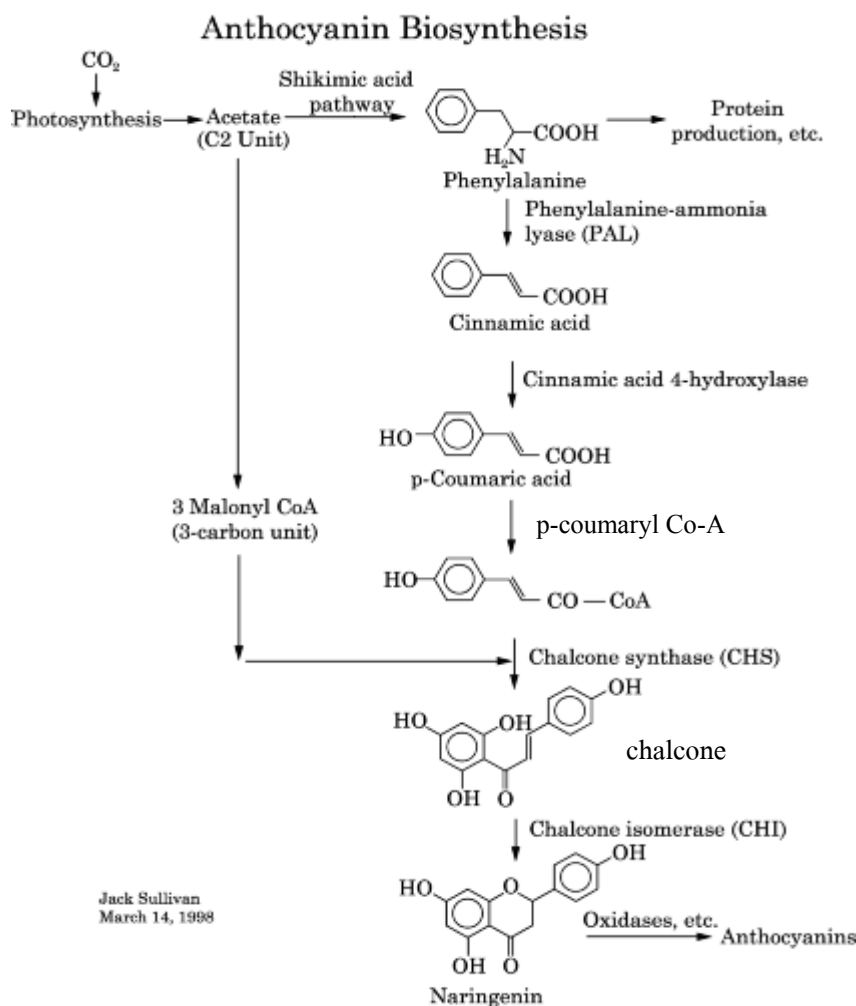
ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของแอนโทไซยานิน (ที่มา: Harborne, 1986)

2.3.1 การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (anthocyanin biosynthesis)

แอนโทไซยานินมีวิธีการสังเคราะห์เริ่มจาก acetate (C2 unit) ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงเข้าสู่ shikimic acid pathway แล้วเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้น คือ กรดอะมิโน phenylalanine จากนั้น phenylalanine จะถูกเปลี่ยนเป็น cinnamic acid โดยมีเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) เร่งปฏิกิริยา cinnamic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น p-coumaric acid จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น p-coumaryl co-A แล้วเปลี่ยนเป็น chalcone (C15 unit) โดยมีเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เร่งปฏิกิริยา จากนั้น chalcone จะถูกเปลี่ยนเป็น nariginine โดยมีเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) เร่งปฏิกิริยา แล้ว nariginine จะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโทไซยานินต่อไป การสังเคราะห์แอนโทไซยานินอีกวิธีหนึ่งมาจากการเปลี่ยน acetate (C2 unit) ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงไปเป็น malonyl Co-A (C3 unit) 3 โมเลกุลแล้วเข้าร่วมกับ p-coumaryl Co-A เพื่อเปลี่ยนเป็น chalcone โดยมีเอนไซม์ CHS เร่งปฏิกิริยา จากนั้น chalcone จะถูกเปลี่ยนเป็น nariginine โดยมีเอนไซม์ CHI เร่งปฏิกิริยา แล้ว nariginine จะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโทไซยานินต่อไป (anthocyanin biosynthesis pathway ได้แสดงในภาพที่ 2.3)

ตารางที่ 2.1 แอนโทไซยานินชนิดต่างๆที่เกิดจากการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทิลในตำแหน่ง R- (ดัดแปลงจาก Harborne, 1986)

Anthocyanidin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
<u>Cyanidin</u>	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
<u>Delphinidin</u>	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
<u>Pelargonidin</u>	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
<u>Malvidin</u>	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
<u>Peonidin</u>	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
<u>Petunidin</u>	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH



ภาพที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (ดัดแปลงจาก Sullivan, 1998)

2.4 แอนโทไซยานินกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity)

2.4.1 อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสาร หรือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpair electron) อยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) แล้วกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป ส่วนมากแล้วเกิดกับโมเลกุลของออกซิเจน (จักรพงษ์ ไพบุลย์, 2542) เช่น superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) hydroxyl radical (HO^{\cdot}) peroxide radical (ROO^{\cdot}) hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น อนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายมนุษย์ และเกิดจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสียจากเขม่าเครื่องยนต์ควันบุหรี่ สารเคมีต่าง ๆ รังสี UV และจากการรับประทานอาหารปิ้งย่างที่ไหม้เกรียม ส่งผลให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ เช่น เซลล์ถูกทำลาย เกิดการเสื่อมของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเยื่อหุ้มเซลล์ รุนแรง

ไปถึงการเกิดเป็นโรค เช่น โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน เป็นต้น มนุษย์สามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านี้ได้โดย 1) ใช้เอนไซม์ที่สร้างในร่างกายกำจัด เช่น superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GPX) แต่การกำจัดอนุมูลอิสระด้วยเอนไซม์มักมีขีดจำกัด เช่น บางคนมีพันธุกรรมที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้น้อย 2) เพิ่มความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้โดยรับประทานอาหาร ผักผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และแอนโทไซยานิน (จักรพงษ์ ไพบุลย์, 2542)

2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารที่มีโครงสร้างที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และหยุดการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ ลอดัตราการเกิดโรคร้ายแรงต่าง ๆ ที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ (พรทิพย์ วิรัชวงศ์, ม.ป.ป.)

แอนโทไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีโครงสร้างที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และหยุดการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ ลอดัตราการเกิดโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ ในสมัยก่อนชาวกรีกได้นำผลไม้ที่มีสีม่วงมาพอกหน้า พอกตัว เพราะเชื่อว่าจะทำให้ผิวพรรณดูอ่อนกว่าวัย (Sullivan, 1998) การรับประทาน Bilberries (*Vaccinium myrtillus*) ทำให้มองเห็นในที่มืดได้ดีขึ้น (Lila, 2004) การดื่มไวน์แดง (red wine) ที่มี polyphenolic ต่าง ๆ รวมทั้งแอนโทไซยานิน สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (Blando *et al.*, 2004) การรับประทานผักและผลไม้ที่มีแอนโทไซยานินสามารถยับยั้งการลุกลามของเนื้องอก ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และลดระดับไขมันในเลือดได้ (Wrolstad, 2001) แอนโทไซยานินสามารถป้องกันโรคเบาหวานได้ Nair (2004) รายงานว่า การนำแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากผลเชอร์รี่ไปทดลองกับเซลล์ตับอ่อนของหนูทดลองในหลอดทดลอง พบว่าแอนโทไซยานินสามารถกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อนสร้างอินซูลิน (insulin) เพิ่มขึ้น ซึ่งอินซูลินทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด Duan *et al.* (2007) รายงานว่าแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากเปลือกของลิ้นจี่ (*Lichi chinensis* Sonn.) สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ linoleic acid ในหลอดทดลองได้ และ Rottmann *et al.* (2002) รายงานว่า แอนโทไซยานินที่มีในน้ำสกัดของผล ach (*Aristotelia chilensis*) ผล blackberry (*Rubus* spp.) ผล cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) ผล blueberry (*Vaccinium corymbosum*) และผล raspberry (*Rubus idaeus*) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ในหลอดทดลองได้ (LDL ได้จากการสกัดจากเลือดของหนูทดลอง) ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกัน และรักษาภาวะไขมันอุดตันในเส้นเลือด และโรคหลอดเลือดหัวใจที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ต่อไป

2.5 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ได้มีการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการส่งเสริมสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เพราะเชื่อว่าสามารถลดปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้ (Molyneux, 2004) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญ เพื่อใช้บอกประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ หากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระสูงด้วยเช่นกัน วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น oxygen radical absorbance capacity (ORAC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay และ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radical decolorization assay เป็นต้น

Sampantachit and Supasiri (2004) ได้ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้ไทย 4 ชนิด โดยใช้สารสกัดหยาบที่ใช้เมทานอลเป็นตัวสกัดของมะเขือม่วง ดอกแคแดง ใบแคแดง และแก้วมังกรขาว จากการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากใบแคแดงมีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เมื่อใช้ DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} ของการยับยั้ง DPPH เท่ากับ $750 \mu\text{g/ml}$ และจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในพืชทั้ง 4 ชนิด พบว่า ใบแคแดงมีสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ $125.2 \mu\text{g/ml}$

Chaovanalikit (2004) ได้ทำการทดลองเรื่อง สารรงควัตถุแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในผลไม้บลูอันนี่ซึกเกิล ได้มีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในผลไม้บลูอันนี่ซึกเกิล 10 พันธุ์ พบว่า ผลไม้บลูอันนี่ซึกเกิลมีปริมาณแอนโทไซยานิน 116-593 มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักสด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 440-1142 มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักสด การวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน การวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC เท่ากับ 18-104 μM ของ trolox/กรัม น้ำหนักสด และวิธี FRAP 38-94 μM ของ trolox/กรัม น้ำหนักสด และได้หาความสัมพันธ์ของโดยใช้วิธีทางสถิติ พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิก

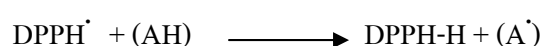
เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุต (2547) ได้ทำการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกระชายดำและน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากกระชายดำโดยใช้ 3 วิธี คือ 1) ABTS free radical decolorization assay โดยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันถูกประเมินออกมาในรูปของ vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC), pyrogallol equivalent antioxidant capacity (PEAC) และ quercetin equivalent antioxidant capacity (QEAC) 2) superoxide anion scavenging และ 3) nitric oxide scavenging พบว่าสารสกัดกระชายดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน vitamin C,

pyrogallol และ quercetin เท่ากับ 21.84, 5.30 และ 21.8 mg/g ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide มีค่า IC_{50} เท่ากับ 163.8 $\mu\text{g/ml}$ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ nitricoxide มี %inhibition สูงสุดเท่ากับ 38.44%

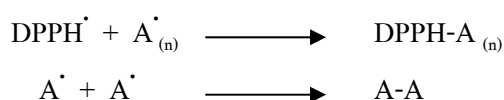
แอนโทไซยานินที่สกัดได้จากราสพ์เบอร์รี่ มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ใช้ IC_{50} เป็นดัชนีวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) จากการวัดด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 5.10 mmol/100 กรัม น้ำหนักสด (Miller *et al.*, 2000) วิธี ABTS เท่ากับ 1.85 mmol/100 กรัม น้ำหนักสด (Proteggente *et al.*, 2002) แอนโทไซยานินที่สกัดได้จากเชอร์รี่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการวัดด้วยวิธี ORAC เท่ากับ 1.8 mmol ของ trolox /100 กรัม น้ำหนักสด วิธี ABTS เท่ากับ 2.7 mmol ของ trolox /100 กรัม น้ำหนักสด (Blando *et al.*, 2004)

2.5.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

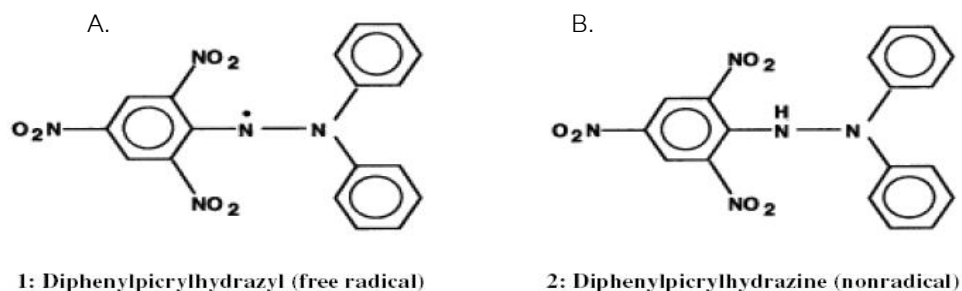
DPPH เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH นี้ มีหลักการที่ สารเคมี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) นี้เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความคงตัว เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย DPPH จะมีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยผสม DPPH \cdot และสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ (AH) ในหลอดทดลอง ซึ่งเกิดปฏิกิริยากันดังสมการนี้



อนุมูลอิสระใหม่ที่เกิดขึ้น (A^{\cdot}) จะทำปฏิกิริยาต่อไป (radical-radical interaction) โดยกระบวนการ radical disproportionation จนกระทั่งได้เป็นโมเลกุลที่มีความคงตัว (A-A) ดังสมการนี้



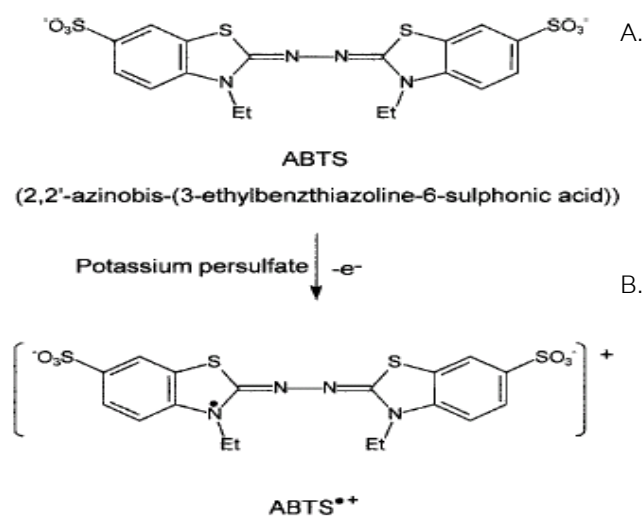
เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH^{\cdot} ได้รับความโปรตอนจากสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบ สารละลาย DPPH ก็จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ลดลง



ภาพที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ DPPH ที่เป็นอนุมูลอิสระ (A.) และไม่เป็นอนุมูลอิสระ (B.) (Molyneux, 2004)

2.5.2 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) free radical decolorization assay

วิธี ABTS เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีหลักการคล้ายกับวิธี DPPH คือ สร้างอนุมูลอิสระที่มีสีขึ้น โดยสร้างอนุมูลอิสระจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS กับ oxidizing agent คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อ ABTS ถูกออกซิไดซ์ ด้วย oxidizing agent จะเกิด ABTS free radical ($ABTS^{•+}$) สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการนำมาทดสอบจะขจัด $ABTS^{•+}$ ที่เกิดขึ้นแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm (เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2547) โดยหากค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากหรือสีของสารละลายจางลงมากจะแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (อนุพงษ์ ศิริเมืองมูล และคณะ, 2547)



ภาพที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของ ABTS ที่อยู่ในรูปไม่เป็นอนุมูลอิสระ (A.) และเป็นอนุมูลอิสระ (B.)

2.5.3 ฤทธิ์การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL)

2.5.3.1 คอเลสเตอรอล (cholesterol)

คอเลสเตอรอล เป็นสารประเภทไขมันที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด ช่วยสร้างความแข็งแรงให้ผนังเซลล์และมีหน้าที่สำคัญในร่างกาย เป็นสิ่งจำเป็นช่วยให้ร่างกายทำงานได้ คอเลสเตอรอลถูกผลิตจากตับ แล้วส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ทางเส้นเลือดให้แก่เซลล์ โดยเซลล์จะรับไปในจำนวนที่ต้องการ คอเลสเตอรอลจะจับตัวอยู่กับโปรตีนเรียกว่าไลโปโปรตีน (lipoprotein) ซึ่งมี 2 รูปแบบ คือ 1) ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL) หรือคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี เป็นชนิดที่ร่างกายไม่ต้องการ 2) ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein; HDL) หรือคอเลสเตอรอลชนิดดี จะช่วยขับคอเลสเตอรอลที่เกินต้องการออกจากร่างกายด้วย (จตุรรวมแหล่งข้อมูลทางการแพทย์และยา, 2549)

หากร่างกายมี LDL ในปริมาณมากทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL (LDL oxidation) มากขึ้นด้วย การเกิด LDL oxidation จะทำให้ LDL จับตัวกันเป็นก้อนและจะเกาะติดผนังหลอดเลือดแดงที่เรียกว่า plaque ทำให้หลอดเลือดตีบ ขัดขวางการไหลเวียนของกระแสเลือด หากเกิดกับหลอดเลือดที่หล่อเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจอาจทำให้หลอดเลือดหัวใจอุดตันและทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery) ได้

2.5.3.2 การวัดฤทธิ์การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL oxidation)

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ซึ่งเป็นพลาสมาโปรตีนที่ขนส่งคอเลสเตอรอลเป็นส่วนใหญ่จะทำให้ LDL เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformation) เป็นผลให้ตัวรับจำเพาะ (LDL receptor) บนผิวเซลล์ไม่สามารถรับและส่งต่อ cholesterol เข้าไปในเซลล์ได้ทำให้เกิดการสะสมของก้อนไขมันในเส้นเลือดหรือภาวะอุดกั้นของเส้นเลือด (Atherosclerosis) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสามารถที่จะยับยั้ง LDL oxidation ได้ (Rottmann *et al.*, 2002)

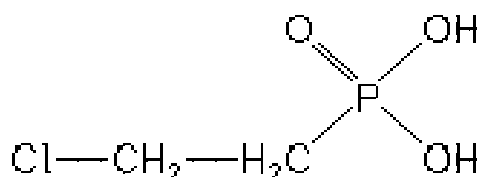
Young and McEneny (2001) ศึกษาการกลไกการเกิดปฏิกิริยาเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation โดยใช้ CuSO_4 กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา LDL oxidation แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm (วัดค่าการดูดกลืนแสงของ conjugated diene (CD) ที่จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation) พบว่า ปฏิกิริยา LDL oxidation แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ 1) ระยะเริ่มต้นการสร้าง CD (lag phase) 2) ระยะเพิ่มปริมาณการสร้าง CD และ 3) ระยะการสลายตัวของ CD (decomposition phase)

Chang *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ที่ส่งผลต่อระดับคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (low density lipoprotein; LDL) ในหลอดทดลอง (ใช้ LDL จากหนู) วิธีการศึกษาโดยเหนี่ยวนำให้ LDL เกิด oxidation ด้วย CuSO_4 แล้วทำการวัดระดับของสารที่เกิดจากการ oxidation คือ conjugated diene (CD) ที่เวลา 6 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง (ซึ่งมีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบด้วย) พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งการ oxidation ของ LDL ได้ Rottmann *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation ในหลอดทดลองของสารสกัดแอนโทไซยานินจากผล ach (*Aritotelia chilensis*) สารสกัดจากผล ach มีปริมาณแอนโทไซยานิน 161-265 มิลลิกรัม/100 มิลลิกรัม น้ำหนักสด การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation ใช้ LDL ของมนุษย์ที่เตรียมจากวิธี zonal centrifugation (Heinonen and Myer, 1998) โดยใช้ LDL 50 $\mu\text{g/ml}$, CuSO_4 5 μM ใน Phosphate Buffer Saline (PBS) เติมสารสกัดจากผล ach 1 μM ที่อุณหภูมิ 37°C ให้ปฏิกิริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมสารสกัดจากผล ach เป็นกลุ่มควบคุม แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm ทุก 5 นาที นาน 360 นาที จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากผล ach มี lag time 250 นาที ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกลุ่มควบคุม (110 นาที) และ Yen *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation ในหลอดทดลองของสารสกัดของ Haw fruit (*Opuntia dillenii*) โดยใช้ LDL ของมนุษย์ที่สกัดจากเลือด (โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูงจนเกิดการแยกชั้นของ LDL) ใช้ LDL 100 $\mu\text{g/ml}$, CuSO_4 10 μM ใน Phosphate Buffer Saline (PBS) เติมสารสกัดของ Haw fruit 250 $\mu\text{g/ml}$ ที่อุณหภูมิ 37°C ให้ปฏิกิริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมสารสกัดของ Haw fruit เป็นกลุ่มควบคุม แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm ทุก 15 นาที นาน 240 นาที จากการทดลอง พบว่า สารสกัดของ Haw fruit มี lag time 236 นาที ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกลุ่มควบคุม (154 นาที)

2.6 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.6.1 อิทธิพลของเอทีฟอน (ethephon ; 2-chloroethylphosphonic acid)

เอทีฟอนเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดหนึ่ง ที่สามารถปลดปล่อยก๊าซ ethylene ออกมาได้ (สูตร โครงสร้างของเอทีฟอนแสดงในภาพที่ 2.6) โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้เอทีฟอนใช้ในการบ่ม และการเร่งสีของผลไม้ เร่งการสุกของผลไม้ ทำให้ผลเปลี่ยนสีได้รวดเร็ว และสม่ำเสมอ ซึ่งเอทีฟอนสามารถกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ และกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุชนิดอื่นๆ เช่น แอนโทไซยานิน ไลโคปีน เบต้าแคโรทีน เป็นต้น (พีรเดช ทองอำไพ, 2537)



ภาพที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของเอทีฟอน (ที่มา: ชยพร แอคะรัตน์, 2548.)

มีรายงานการศึกษาที่ระบุว่าเอทีฟอนสามารถเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินได้ เช่น การใช้เอทีฟอนความเข้มข้น 400 ppm สามารถเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในมะม่วงพันธุ์มหาชนก (ชนากรณ์ ศรีศิริพันธุ์ และคณะ, 2549) 100 ppm ในแอปเปิลพันธุ์ 'Fuji' (Li *et al.*, 2002) 100 ppm ในแอปเปิลพันธุ์ 'Tsugaru' (จามรี สิงห์แก้ว, 2550) และ 100 ppm ในบลูเบอร์รี่พันธุ์ 'Rabbiteye' (Ban *et al.*, 2006)

2.7 รายการอ้างอิง

- เกษร เมืองทิพย์. (2549). พฤกษศาสตร์ พันธุ์ การเจริญเติบโต และการพัฒนาการติดผลและเมล็ด และแอนโทไซยานินในกวางเครือแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาคุณวุฒิบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- กัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และ พัชรี บุญศิริ. (2542). โปรออกซิแดนซ์ อีกโฉมหน้าของแอนติออกซิแดนซ์. วารสารวิทยาศาสตร์. 1(10): 196-198.
- จักรพงษ์ ไพบูลย์. (2542). อนุมูลอิสระ และสารต่อต้านอนุมูลอิสระ [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thaiclinic.com/antioxidant.html>
- จามรี สิงห์แก้ว. (2550). ผลของ abscisic acid (ABA) abscisic acid analog (ABA) Ethephon และ aminoethoxyvinylglycin (AVG) ที่มีต่อสีผิวของแอปเปิลพันธุ์ Tsugaru. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิระศักดิ์ กิรติคุณากร และไพฑูรย์ พิสุทธิสินธุ์. (2543). คู่มือการตรวจสอบกวางเครือและทองเครือ. ฝ่ายพันธุ์พืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- จตุรรมแหล่งข้อมูลทางการแพทย์และยา.(2549). ไขมันและคอเลสเตอรอล. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://rx12.wsnhosting.com/panpup/cholesterol.html>

- เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุด. (2547). การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกระชายดำและน้ำมันก๊วยภาพที่สกัดจากกระชายดำ [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_R10003-47.pdf.
- ชยพร แอคะรัตน์. (2548). สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.geocities.com/kalasin044/index.html>
- ชวลิต นิยมธรรม. (2538). กวาวเครือ. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ: เพื่อนพิมพ์. 495 หน้า.
- เต็ม สมิตินันท์. (2523). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ. 379 หน้า.
- ทิพรัตน์ หงส์ภัทรศิริ. (2548). รายงานวิจัย เรื่องการศึกษาและพัฒนาคุณสมบัติในกำจัดอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ไวน์ผลไม้ โดยใช้สมุนไพรและเครื่องเทศ. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.
- ทองทิศ ทองใหญ่. (2546). กวาวเครือความภูมิใจของผู้ชาย ความมั่นใจของผู้หญิง [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.airissofia.com>.
- ธานีป รักศิลป์. (2538). องค์ประกอบทางเคมีในหัวกวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธนาภรณ์ ศรีศิริพันธุ์ และคณะ. (2549). ผลของเอทีฟอนและกรดแอบไซซิกต่อปริมาณของแอนโทไซยานินและแอกทิวิตีของพินิลอะลานีนแอมโมเนีย-ไลเอส ในเปลือกผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 37: 5(พิเศษ): 156-159.
- นิสากร ปานประสงค์. (2542). กวาวเครือความหวังสมุนไพรไทย. วารสาร UPDATE กันยายน-ตุลาคม. หน้า 40-45.
- พีรเดช ทองอำไพ. (2537). สอโรมันพืชและสารสังเคราะห์: แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 196 หน้า.
- พรทิพย์ วิรัชวงศ์. (ม.ป.ป.) สารอนุมูลอิสระและอันตรายของอนุมูลอิสระ [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html>.
- ภavana อัสวประภา. (2545). คู่มือการปลูกสมุนไพร. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. 45 หน้า.
- มหัศจรรย์แห่งสมุนไพรไทย. (2547) [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thai.net>
- รุจน์ สุทธิศรี. (2542). บทความกวาวเครือขาว. ภาควิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วารุณี วงศ์ชมพู. (2543). ผลของแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดต่อแอกทิวิตีของเอ็นไซม์พินิลอะลานีนแอมโมเนีย-ไลเอส และการพัฒนาสีแดงในเปลือกมะม่วง

พันธุ์เคนท์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่.

วุฒิ ธรรมวุฒิเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: ไทย-ยูโร
โปรเจกต์. 206 หน้า.

สิทธิศักดิ์ ปิ่นมงคลกุล. (2545). การเปรียบเทียบผลของกวางเครือแดง (*Betea superba* Roxb.) ที่
พบในพื้นที่ที่แตกต่างกันสองพื้นที่ ต่ออวัยวะสืบพันธุ์ พฤติกรรมการสืบพันธุ์ และ
การแข็งตัวของอวัยวะเพศในหนูขาวเพศผู้ (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2537). พฤกษศาสตร์. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว. 277 หน้า.

สมพร ภูคียนันท์. (2542). ตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพร: ภาคพิเศษ. องค์การสงเคราะห์ทหาร
ผ่านศึก. กรุงเทพฯ. 991 หน้า.

โศภณ เรืองสำราญ และคณะ. (2543). ฟลาโวนอยด์ และฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ จากกวางเครือ
แดงและฤทธิ์ต่อต้านไซคริกเอเอ็มพีเอสไฟไลเอสทอเรส. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 25(1): 169-176.

อนุพงศ์ ศิริเมืองมูล และคณะ. (2547). ผลของการแปรรูปโดยใช้ความร้อนต่อคุณสมบัติการต้าน
อนุมูลอิสระในน้ำมะเกี๋ยง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะ
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อรดี สหวัชรินทร์. (2542). กวางเครือ สมุนไพรครอบจักรวาล. วารสารเคหการเกษตร. 23(4):
127-136.

Aksaranugraha S. (2003). Free radicals-production of exercise. *Chula Med J.* 47(3): 139-148.

Antioxidant power of phytochemicals from Psidium guajava leaf. [On-line]. Available:
<http://www.sciencedirect.com>

Ban, T., Kugishima, M., Ogata, T., Shiozak, S., Horiuchi, S. and Ueda, H. (2006). **Effect of
ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on the fruit ripening characters of
rabbiteye blueberry** [On-line]. Available: <http://www.sciencedirect.com>

Blando, F., Gerardi, C. and Nicoletti, I. (2004). Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanin as
ingredients for functional food. *Journal of biomedicine and biotechnology.* 5: 235-
238.

Blankenship, S.M. and Unrath, C.R. (1988). PAL and ethelene content during maturation of
'Red' and 'Golden Delicious' apple. *Phytochem.* 27(4): 1001-1003

- Bowry, V. W., Ingold, K. U., and Stocker, R. (1992). Vitamin E in human low-density lipoprotein: when and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. **Biochem. J.** 288(2): 341-344.
- Camm, E.L. and Towers, G.H.N. (1973). Phenylalanine ammonia-lyase. **Phytochem.** (12): 961-973.
- Cao, G., Alessio, H.M. and Culture, R.G. (1993). Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.** 14: 303-311.
- Chang Y.C., Huang HP, Hsu JD, Yang SF, Wang CJ. (2005). Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptosis cell death in human promyelocytic leukemia cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 205: 201-212.
- Chaovanalikit, A. (2004). Anthocyanins, total phenolics, and antioxidant capacity of bluehoneysuckles. In **Abstracts and A CD articles of The 30th Congress on Science and Technology of Thailand**. Bangkok: Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani.
- Donald, R.B. and Miranda, C. (2001). **Antioxidant activity of flavonoids**. Seminar Series, January. 2: 1-3. Oregon State University, USA.
- Department of Health and Human Services. (2005). **Cholesterol** [On-line]. Available: <http://www.thailabonline.com/lab-cholesterol1.htm>
- Duan, X., Jaing, Y., Su, X., Zhang, Z. and Shi, J. (2007). Antioxidant properties of anhocyanin extracted from lichi (*Lichi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissue in relation to their role in pericarp browning. **Food Chemistry**. 101: 1365-1371.
- Dugas, T. R., Morel, D. W., and Harrison, E. H. (1998) Impact of LDL carotenoid and alpha-tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture. **J. Lipid Res.** 39(5): 999-1007.
- Harborne, J.B. (1994). **The flavonoid**. New York: Chapman & Hall. 676 p.
- Helvorson, B.L. et al. (2002). A systemic screening of total antioxidants in dietary plants. **Journal of nutrition**. 321: 461-471.
- Hirunpanich V., Utaipat A, Phumala Morales N, Bunyaphatsara N, Sato H, Herunsalee A, Suthisisang C. (2005). Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (roselle) in vivo using rat low-density lipoprotein (LDL). **Biol. Pharm. Bull.** 28: 481-484.

- Jacob, R.A. and Burri, B. (1996). Oxidative damage and defense. **American Journal of Chemical Nutrition**. 639: 855-905.
- Li, Z.H., Sugaya, S., Gemma, H. and Iwahori, S. (2002). Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus-calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis. **Scientia Horticulture**. 94: 193-199.
- Lila, M.A. 2004. Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 5: 306-313.
- Mazza, G. and Maniati, E. (1993). **Anthocyanin in fruits, vegetables and grains**. Boca Raton, FL: CRC Press. 362 p.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Beek, T.A. (2003). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**. 85(2): 231-237.
- Miller, H.E., Regelhof, F., Marqaurt, L., Prakash, A. and Kanter, M. (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereal, fruits and vegetables. **Journal of American college of nutrition**. 19: 312-319.
- Miller, N.J. and Paganga, G. (1998). Antioxidant activity of low density lipoprotein. In A. Armstrong (ed.). **Free radical and antioxidant protocols**. 108: 225-235. Totowa, NJ: Human Press.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin. J. Sci. Technol**. 26(2): 211-219.
- Moyer, P. (2001). **The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigment and Polyphenolics** [On-line]. Available: <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>
- Nair, M. (2004). **Chemicals Found In Cherries May Help Fight Diabetes** [On-line]. Available: <http://www.sciencedaily.com/releases/2004/12/041220122203.htm>
- Ohmiya, A. (2000). Effect of auxin on growth and ripening pericarp discs of peach fruit. **Sci. Hort**. 84: 309-319.
- Papas A.M. (1989). Diet and antioxidant status. In **Antioxidant status, diet, nutrition, and health** (pp 89-95). New York: CRC Press.
- Papas A.M. (1999). Determinants of antioxidant status in humans. In **Antioxidant status, diet, nutrition, and health** (pp 21-36). New York: CRC Press.

- Pederson, H., Petersen, M., Jensen, T. and Nielsen, N.S. (2003). Influence of fish oil supplementation on in vivo and in vitro oxidation resistance of low density lipoprotein in type 2 diabetes. **Eur. J. Clin. Nutr.** 57: 713-720.
- Pinelo, M., Landbo, A.K., Vikbjerg, A.F. and Meyer, A.S. (2006). **J. Agric. Food Chem.** 54(18): 6564-6571.
- Proteggente, A.R. et al. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruits and vegetables reflect their phenolic. **Free radical research.** 36: 217-233.
- Rottmann, S.M., Augusto, A., Druso, D., Alvado, L.F. and Leighton, F. (2002). Juice and phenolic fractions of the berry inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. **Food Chem.** 70(2): 2-3.
- Rodrigo, R. and Rivera, G. (2002). Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Rad. Biol. Med.** 33: 409-422.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N. Glories, Y. and Vivas, N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Res. Int.** 32: 327-333.
- Sampantachit, R. and Supasiri, T. (2004). **Study of the antioxidant property of four Thai plants.** Department of chemistry Srinakarinwirot University, Bangkok.
- Saure, M.C. (1990). External control of anthocyanin formation in apple. **Sci. Hortic.** 42: 181-218.
- Sawa, T. Nakao, M. Akaike, T. Ono, K. and Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the antitumor-promoter effect of vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 47: 397-402.
- Scavenging the hydroxyl radical by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl** [On-line]. Available: http://www.arkat-usa.org/ark/journal/2002/I02_Nenitzescu/CN-291A/291A.asp
- Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. **Food Res. Int.** 33: 469-474.
- Sullivan, J. (1998). **Anthocyanin** [On-line]. Available: <http://www.carnivorousplants.org/cpn/samples/Science273anthocyanin.htm>
- Sun, A.Y. Simonyi, A. and Sun, G.Y. (2002). The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Rad. Biol. Med.** 32: 314-318.
- Wang C.J., Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chu FP, Tseng TW. (2005). Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. **Food Chem Toxicol.** 2000(38): 411-416.

- Wrolstad, R.E. (2001). **The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigments and Polyphenolics** [On-line]. Available: <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>
- Yen, G.C., Chang, S.F. and Hsieh, C.L. (2007). The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low density lipoprotein peroxidation and its active compound. **Food Chemistry**. 106(2008): 569-575.
- Young, I.S. and McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. **Biochemical Society Transactions**. 29(2): 358-362.

บทที่ 3

การศึกษาการเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของ กวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) ด้วยเอทีฟอน

บทคัดย่อ

กวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้มาแต่สมัยโบราณ มีสรรพคุณเป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงโลหิต รากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงมีแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถลดความเสี่ยงจากโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุได้ แอนโทไซยานินจึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เพื่อเป็นแนวทางในการปลูกกวาวเครือแดงให้มีแอนโทไซยานินสูง ได้ ทำการศึกษาการเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงด้วยเอทีฟอน ทำการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายน 2550 ถึงตุลาคม 2550 ที่แปลงปลูกกวาวเครือแดงในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 3 ซ้ำ 5 ทริตเมนต์ คือ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 0 (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น), 100, 200, 300 และ 400 ppm ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า การฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลาง ลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก และน้ำหนักสดของรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแตกต่างกันทางสถิติ แต่ทำให้ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์และปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้มีความหนาเฉลี่ยของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงมากที่สุด คือ 3.96 และ 4.27 มิลลิเมตร และทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงมากที่สุด คือ 37.63 และ 40.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักสด สรุปได้ว่า การฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ให้แก่กวาวเครือแดง สามารถเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารได้

3.1 บทนำ

กวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่ง ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงมีแอนโทไซยานิน (anthocyanin) (เกษร เมืองทิพย์, 2549) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุได้ เช่น โรคหลอดเลือด

หัวใจ โรคมะเร็ง และโรคเบาหวาน เป็นต้น แอนโทไซยานินจึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์และมีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกัน และรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้

การเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มคุณภาพของกวาวเครือได้ วิโรจน์ เชาววิเศษ (2550) ได้ศึกษาผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว พบว่า การฉีดพ่นด้วยสังกะสีที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้กวาวเครือขาวมีการสะสม puerarin มากที่สุด จารุจินันท์ หล้ากวนวัน (2549) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงและการสะสมสาร phytoesterol พบว่า การให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กก./ไร่ ร่วมกับการฉีดพ่น NAA 100 ppm และการให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กก./ไร่ ร่วมกับการให้ GA_3 100 ppm ทำให้ปริมาณสาร phytoesterol ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงเฉลี่ยสูงที่สุด

จากการตรวจเอกสารงานวิจัยต่าง ๆ พบว่า เอทิฟอนสามารถเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในพืชหลายชนิดได้ เช่น การฉีดพ่นเอทิฟอน 400 ppm ทำให้มะม่วงพันธุ์มหาชนกมีปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น (ชนาภรณ์ ศรีศิริพันธุ์ และคณะ, 2549) การฉีดพ่นเอทิฟอน 100 ppm ทำให้แอปเปิ้ลมีปริมาณ แอนโทไซยานิน ฟลาโวนอล และโพรแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น และทำให้ activity ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ phenylalanine ammoni-lyase (PAL) และ chalcone ismerase (CHI) เพิ่มขึ้น (Li *et al.*, 2002) การฉีดพ่นเอทิฟอน 100 ppm ให้กับผลบลูเบอร์รี่ (พันธุ์ 'Rabbit eye') ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Ban *et al.*, 2006) เอทิฟอนใช้เร่งการสุก และการเร่งสีของผลไม้ โดยกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ และรงควัตถุอื่น ๆ เช่น เบต้าแคโรทีน ไลโคปีน และแอนโทไซยานิน เป็นต้น (พิรเดช ทองอำไพ, 2537) และกระตุ้น activity ของเอนไซม์ PAL ที่เป็นเอนไซม์สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกต่าง ๆ รวมทั้งแอนโทไซยานินด้วย (Camm and Towers, 1973; Saure, 1990) ทำให้พืชสามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นได้ การเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงโดยใช้เอทิฟอนจะเป็นแนวทางในการปลูกกวาวเครือแดงให้มีคุณภาพสูงขึ้น เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องในการป้องกัน และบำบัดรักษาโรค และเพื่อรองรับด้านอุตสาหกรรมต่อไป

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน 2550 ที่แปลงปลูกกวาวเครือแดงในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้ต้นกวาวเครือแดงที่อายุ

4 ปี 10 เดือน ระยะปลูก 2x2 เมตร และวิเคราะห์ผลทางเคมีที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาการผลิตพืช อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3)

3.2.2 แผนการทดลองการให้เอทีฟอน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (randomized complete block design: RCBD) (ภาพที่ 3.1) 3 ซ้ำ (blocks) ซ้ำละ 4 ต้น จำนวน 5 ทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 (T1) กลุ่มควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น)

ทรีตเมนต์ที่ 2 (T2) ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน 100 ppm

ทรีตเมนต์ที่ 3 (T3) ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน 200 ppm

ทรีตเมนต์ที่ 4 (T4) ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน 300 ppm

ทรีตเมนต์ที่ 5 (T5) ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน 400 ppm

เตรียมสารละลายเอทีฟอนด้วยอีเทรล 48 พีจีอาร์ (2-chloroethyl phosphonic acid 48% W/V SL) ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 300 และ 400 ppm เติมสารจับใบ tween20 ลงในสารละลายเอทีฟอนทุกความเข้มข้นในอัตราส่วน 0.1 มิลลิลิตรต่อสารละลาย 1 ลิตรในทุกทรีตเมนต์ (เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมสาร) ใช้เครื่องพ่นสารแบบสะพายข้างความจุ 3 ลิตรแบบใช้แรงดันอากาศ ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ใบของกวางเครือแดงโดยให้เปียกทั่วทั้งใบ (run off) ทำการฉีดพ่นเอทีฟอน 3 ครั้ง ตามระยะเวลาเจริญเติบโตของกวางเครือแดง คือ ระยะเวลาอ่อน ระยะเวลาอ่อนถึงใบเพสลาด ระยะเวลาเพสลาด ดังนี้

ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2550

ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 19 สิงหาคม 2550

ครั้งที่ 3 เมื่อวันที่ 29 กันยายน 2550

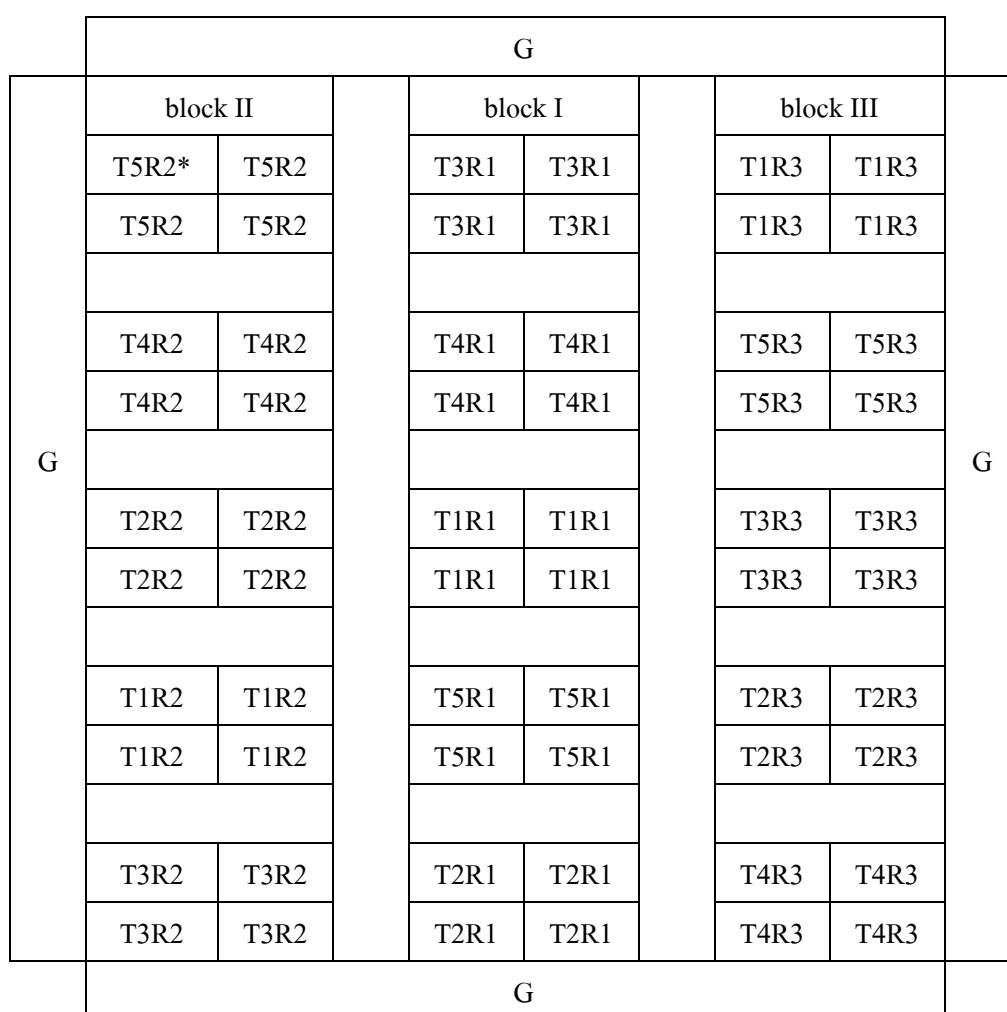
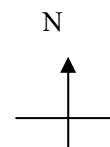
เว้นระยะเวลาหลังฉีดพ่นสาร 1 เดือน ก่อนทำการเก็บข้อมูล ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกอร์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ให้น้ำปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในอัตรา 25 กก./ไร่ เดือนละ 1 ครั้ง และกำจัดวัชพืชทุก 3 สัปดาห์

3.2.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของกวางเครือแดง

เก็บข้อมูลแบบตัวอย่างย่อย (sub sampling) จำนวน 3 บล็อก ในแต่ละบล็อกเก็บตัวอย่างทรีตเมนต์ละ 4 ต้น และหาค่าเฉลี่ยแต่ละบล็อก โดยเก็บข้อมูลดังนี้

1. วัดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ (vernier caliper)
2. วัดการเส้นผ่านศูนย์กลางของรากส่วนที่ขยายใหญ่ที่สุด ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์
3. วัดความยาวรากด้วยสายมาตรวัด

4. ชั่งน้ำหนักสดของรากจากแปลงปลูกด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
5. วัดความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ด้วยไม้บรรทัด



ภาพที่ 3.1 แผนผังแปลงปลูกกวาวเครือแดง ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หมายเหตุ G แทน กวาวเครือขาวที่ปลูกเป็นแนวป้องกัน (guard row)

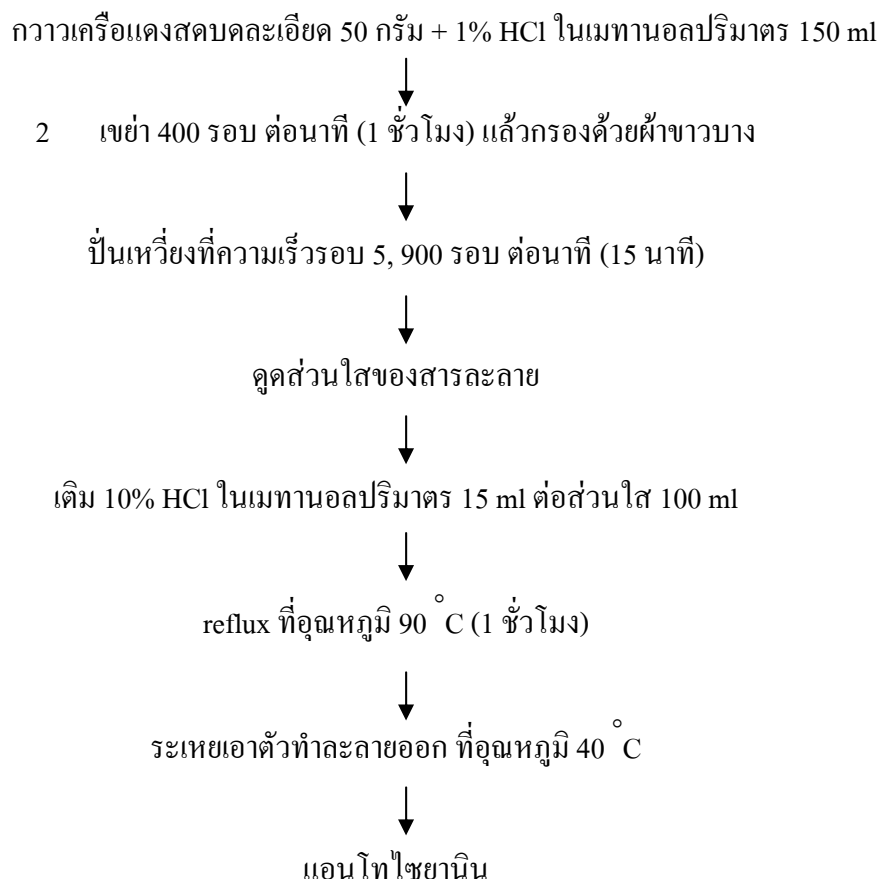
T แทน ทริตเมนต์ของการทดลอง

R แทน ซ้ำของการทดลอง

* 1 ซ้ำ มี 4 sub-samples

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณแอนโทไซยานิน (เกษร เมืองทิพย์, 2550)

การเก็บตัวอย่างรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงจากแปลงปลูกจากทุกทริตเมนต์ ล้างให้สะอาด แล้วปอกเปลือกหั่นเป็นแผ่น นำไปบดให้ละเอียด แล้วทำการสกัดตามขั้นตอน ดังนี้



ภาพที่ 3.2 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดแอนโทไซยานินจากรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

เมื่อได้สารสกัดแอนโทไซยานินแล้ว ปรับปริมาตรให้เป็น 20 ml ด้วยเมทานอล แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการตรวจหาแอนโทไซยานินโดยการแยกด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (thin layer chromatography; TLC) แล้วหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH-differential

1. การตรวจสอบแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

โดยการแยกด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางเคลือบด้วยเซลลูโลส (TLC) (Pre coat TLC plate CEL 300-10 UV₂₅₄ ขนาด 10x20 เซนติเมตร) โดย spot สารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง ลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีดังกล่าว เป็นจุด ๆ ละ 2 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต

ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที สะท้อนโครมาโทกราฟีด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) มี 2 ระบบ ระบบที่ 1 กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอร์มิกและน้ำ ในสัดส่วน 7:51:42 และระบบที่ 2 กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอร์มิกและน้ำในสัดส่วน 25:24:51 (Sherma and Fried, 2003; เกษร เมืองทิพย์, 2549)

2. การหาปริมาณแอนโฆยานินด้วยวิธี pH-differential method (Giusti and Wrolstad, 2000)

2.1 การเตรียมสารละลาย

เตรียมสารละลายไปตัสเซียมคลอไรด์ที่ pH 1 โดยละลายไปตัสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัม ในน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร วัด pH และปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ pH 1.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และเตรียมสารละลายโซเดียมอะซีเตต pH 4.5 โดยละลายโซเดียมอะซีเตตในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร วัด pH และปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ pH 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.2 การเตรียมตัวอย่าง

1. นำสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโฆยานินเป็นส่วนประกอบทริตเมนต์ละ 100 ไมโครลิตร ละลายในสารละลายไปตัสเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตร ที่ pH 1.0 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
2. นำสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโฆยานินเป็นส่วนประกอบทริตเมนต์ละ 100 ไมโครลิตร ละลายในสารละลายโซเดียมอะซีเตต 5 มิลลิลิตร ที่ pH 4.5 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

จากนั้นนำสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโฆยานินเป็นส่วนประกอบทุกทริตเมนต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 510 nm (ที่แอนโฆยานินสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด) และ 700 nm (ที่แอนโฆยานินสามารถดูดกลืนแสงได้น้อยที่สุด) เปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่น แล้วคำนวณหาปริมาณแอนโฆยานิน (Wrolstad *et al.*, 2005) จากสมการนี้

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

$$\text{ปริมาณแอนโฆยานิน} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

$$A_{\max} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } 510 \text{ nm}$$

$$A_{700} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } 700 \text{ nm}$$

$$\text{MW} = \text{มวลโมเลกุลของแอนโฆยานิน} = 449.2$$

$$\text{DF} = \text{dilution factor}$$

$$\epsilon = \text{molar absorptivity (26,900)}$$

$$l = \text{pathlength (cm)}$$

จากสูตรคำนวณดังกล่าว จะได้ปริมาณแอนโทไซยานินเป็นความเข้มข้น (mg/l) แล้วคำนวณปริมาณเป็น ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารกวาวเครือแดงที่ใช้สกัดแอนโทไซยานิน

และได้ตรวจสอบแอนโทไซยานินโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดกวาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบ โดยนำสารสกัดกวาวเครือแดง 200 ไมโครลิตร ละลายในเมทานอล 7 มิลลิลิตร โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกปรับ pH ให้ได้ pH 1-4 และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ปรับ pH ให้ได้ pH 5-14 เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลาย

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

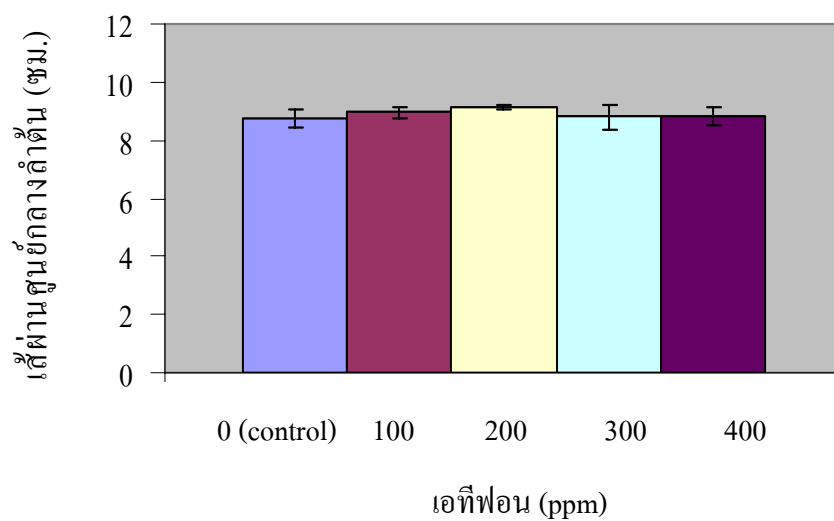
ทำการวิเคราะห์ห้ำเวียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v.13 for window (Levesque and SPSS Inc., 2006) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของลำต้น การเจริญเติบโตของราก และปริมาณแอนโทไซยานินในแต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ของความเข้มข้นของเอทีฟอนกับปริมาณแอนโทไซยานิน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณแอนโทไซยานินกับลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้น และรากกวาวเครือแดง ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก น้ำหนักสดราก และความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของราก

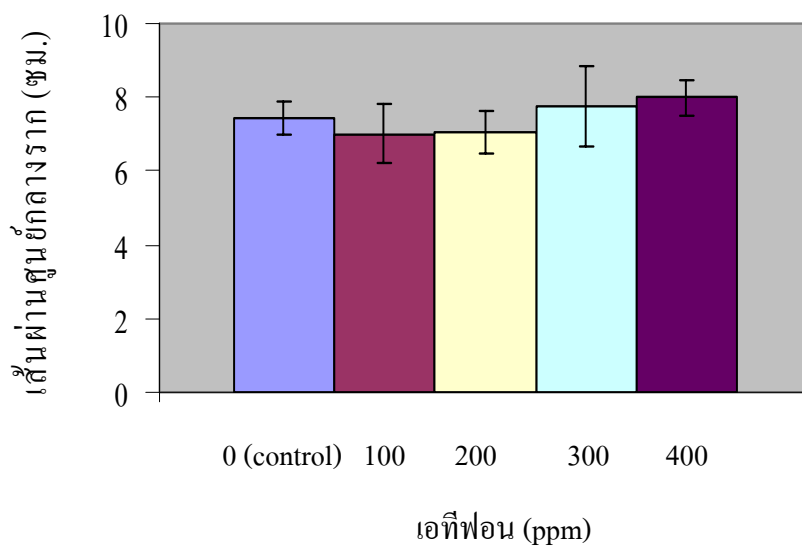
3.3 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

3.3.1 การเจริญเติบโตของลำต้นและรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง

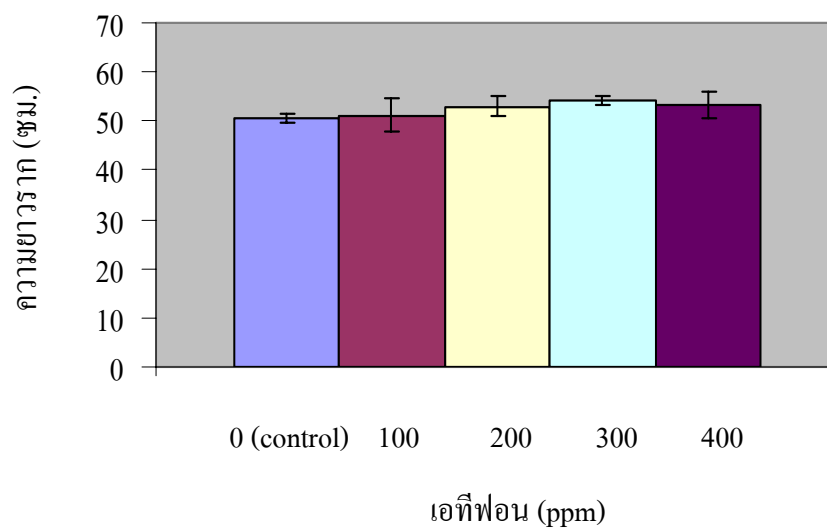
วัดการเจริญเติบโตของลำต้น โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และวัดการเจริญเติบโตของรากสะสมอาหาร โดยวัดความยาวราก เส้นผ่านศูนย์กลางราก น้ำหนักสด และความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง พบว่า การฉีดพ่นเอทีฟอนทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก และน้ำหนักสดของรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 3.3, 3.4, 3.5 และ 3.6 และตารางผนวกที่ 1, 2, 3 และ 4) การฉีดพ่นเอทีฟอนทำให้ความหนาเฉลี่ยของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้มีความหนาเฉลี่ยของชั้นคอร์เท็กซ์มากที่สุด (3.96 และ 4.27 มิลลิเมตร) การไม่ฉีดพ่นเอทีฟอนทำให้ชั้นคอร์เท็กซ์มีความหนาน้อยที่สุด (2.65 มิลลิเมตร) (ภาพที่ 3.7 และตารางภาคผนวกที่ 2 และ 5)



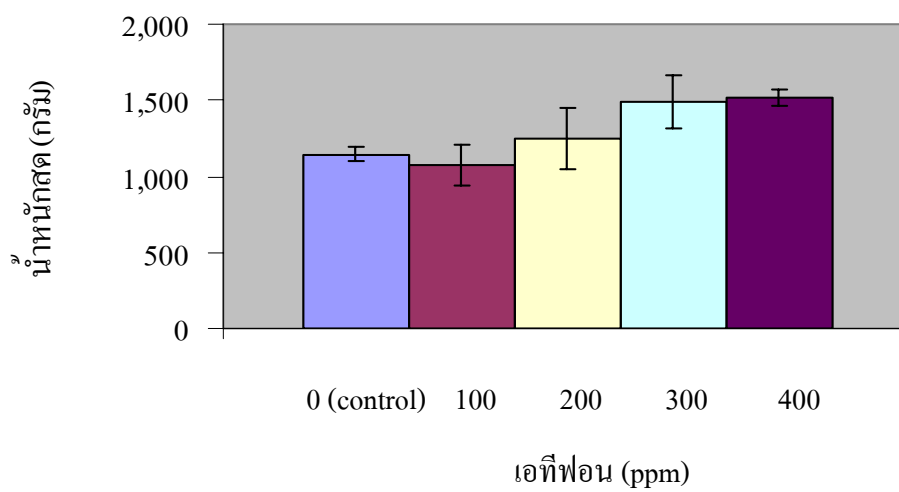
ภาพที่ 3.3 เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของกาวาเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์ (I = SD)



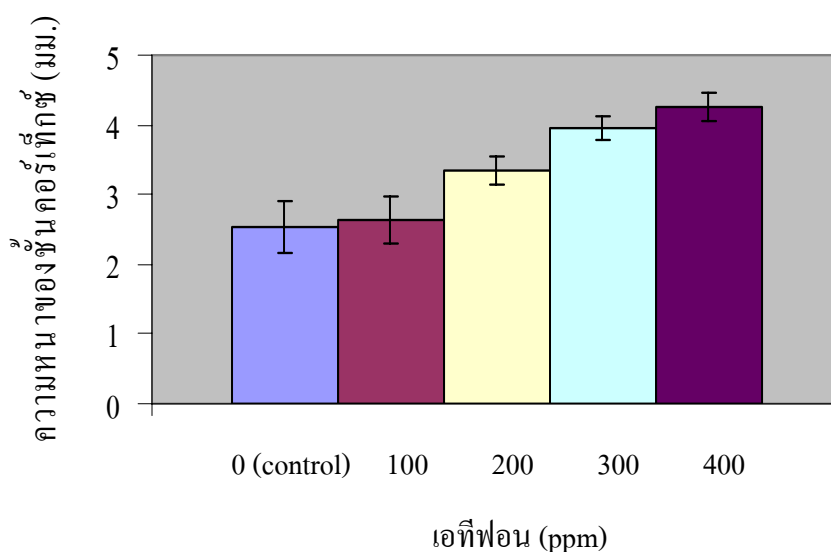
ภาพที่ 3.4 เส้นผ่านศูนย์กลางรากสะสมอาหารของกาวาเครือแดงแต่ละทรีตเมนต์ (I = SD)



ภาพที่ 3.5 ความยาวรากสะสมอาหารของถั่วเขียวแดงแต่ละทรีตเมนต์ (I = SD)



ภาพที่ 3.6 น้ำหนักสดรากสะสมอาหารของถั่วเขียวแดงแต่ละทรีตเมนต์ (I = SD)



ภาพที่ 3.7 ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารกวางเครือแดงแต่ละที่รีดเมนต์ (I = SD)

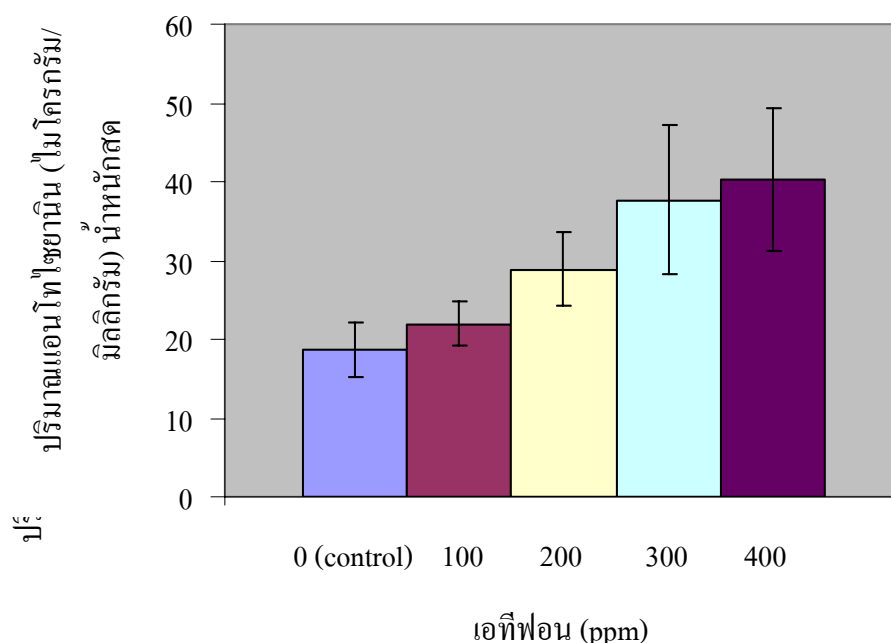
การฉีดพ่นเอทีฟอนทุกความเข้มข้นไม่ทำให้การเจริญเติบโตทางลำต้น และการเจริญเติบโตของรากบางลักษณะ ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก และน้ำหนักสดของรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงแตกต่างกันทางสถิติ แต่ทำให้ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การฉีดพ่นเอทีฟอนไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่มีผลต่อการกระตุ้นการสุกแก่ การเร่งสีของผลไม้ Ban *et al.* (2006) รายงานว่า การฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 100 ppm แก่ผลบลูเบอร์รี่พันธุ์ 'Rabbit eye' หลังจากฉีดพ่น 4 และ 8 วัน ไม่ทำให้น้ำหนักผลแตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น) แต่ทำให้ปริมาณกรดในเนื้อผลและความแข็งของเนื้อผลลดลง และทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น โดยแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม การเปรียบเทียบน้ำหนักผลสามารถบ่งบอกได้ว่าการฉีดพ่นเอทีฟอน 100 ppm ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของผลบลูเบอร์รี่พันธุ์ 'Rabbit eye'

3.3.2 ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

เมื่อได้สารสกัดจากกวางเครือแดง จากนั้นทำการตรวจสอบแอนโทไซยานินโดยการแยกด้วยแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางเคลือบด้วยเซลลูโลส ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) 2 ระบบ ระบบที่ 1 กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอร์มิกและน้ำ ในสัดส่วน 7:51:42 พบว่ามีค่า $R_f = 0.34$ (ภาพผนวกที่ 1A.) และระบบที่ 2 กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอร์มิกและน้ำในสัดส่วน 25:24:51 มีค่า $R_f = 0.12$ (ภาพผนวกที่ 1B.) ซึ่งค่า R_f ของทั้ง 2 ระบบตรงกับ เกษร เมืองทิพย์ (2549) ได้ตรวจสอบสารสกัดแอนโทไซยานินจากรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงด้วยการแยกด้วยแผ่นโครมาโตกราฟี

แบบผิวบางเคลือบด้วยเซลลูโลส และจากการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดแอนโทไซยานิน จากรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง ที่ pH 1.0-4.5 พบว่า ในสภาพที่เป็นกรด (pH < 3) มีสีแดง และสภาพเป็นกลาง (pH 7-8) มีสีม่วง และเป็นเบส (pH > 11) มีสีเขียวอมน้ำตาล (ภาพภาคผนวกที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงสีสารสกัดแอนโทไซยานินจากใบ smoke blush (*Conospermum hookeri*) (นิรนาม, ม.ป.ป.)

การหาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH-differential (Wrolstad *et al.*, 2005) พบว่าการฉีดพ่นเอทีฟอนทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การไม่ฉีดพ่นเอทีฟอนและการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงน้อยที่สุด คือ 18.64 และ 21.99 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200, 300 และ 400 ppm (28.86, 37.63 และ 40.24 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ) การฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200 ppm แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm และการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 ppm และ 400 ppm ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3.8 และตารางภาคผนวกที่ 2 และ 5)



ภาพที่ 3.8 ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงแต่ละที่รติเมนต์ (I = SD)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ของปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงกับลักษณะการเจริญโตของลำต้นและรากกวาวเครือแดง ได้แก่ เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก น้ำหนักสดราก และความหนาของชั้นคอร์-

เท็กซ์ของรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง พบว่า ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์มีผลต่อการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง 99.3% ($r^2 = 0.993$) สมการรีเกรซชัน คือ $Y = -11.189 + 12.145^{**} \text{ thickness of cortex}$ แสดงว่าถ้าความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์เพิ่มขึ้นหรือลดลง 1 มิลลิเมตร จะทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นหรือลดลง 12.145 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม น้ำหนักสด และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเอทีฟอนกับปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง พบว่า ความเข้มข้นของเอทีฟอนมีผลต่อการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง 97.2% ($r^2 = 0.972$) สมการรีเกรซชัน คือ $Y = 17.704 + 0.059^{**} \text{ ethephon}$ แสดงว่าถ้าความเข้มข้นของเอทีฟอนเพิ่มขึ้นหรือลดลง 1 ppm จะทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นหรือลดลง 0.059 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม น้ำหนักสด

การฉีดพ่นเอทีฟอนทำให้แอนโทไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Li *et al.* (2002) รายงานว่า การฉีดพ่นเอทีฟอน 100 ppm ให้แอปเปิลพันธุ์ 'Fuji' ทำให้สารประกอบฟลาโวนอยด์ เช่น แอนโทไซยานิน ฟลาโวนอล และโพรแอนโทไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้น และทำให้ activity ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) และ chalcone isomerase (CHI) เพิ่มขึ้น และชนาภรณ์ ศรีศิริพันธ์ และคณะ (2549) รายงานว่า มะม่วงพันธุ์มหาชนกที่จุ่มผลด้วยสารละลายเอทีฟอนความเข้มข้น 400 ppm มีปริมาณแอนโทไซยานินที่เปลือกผลเพิ่มขึ้น และสามารถกระตุ้นให้ activity ของเอนไซม์ PAL เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากเอนไซม์ PAL เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกต่างๆ รวมทั้งแอนโทไซยานินด้วย (Camm and Towers, 1973; Saure, 1990) สารประกอบฟีนอลิกต่างๆ รวมทั้งแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์กับ activity ของเอนไซม์ PAL เช่น ในรายงานการศึกษาในแอปเปิลพันธุ์ starkimson delicious และ golden delicious ผลองุ่นพันธุ์ grape berry ผลท้อพันธุ์ akatsuki และผลมะม่วงพันธุ์เคนท์ (Blankenship and Unrath, 1988; Jeong *et al.*, 2004; Ohmiya, 2000; วารุณี วงศ์ชมภู, 2543)

มีหลายรายงานการวิจัย พบว่า ปัจจัยที่สามารถชักนำให้พืชสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (รวมทั้งแอนโทไซยานิน) เพิ่มขึ้นได้ เช่น เมื่อถูกรบกวนจากโรคและแมลงพืชจะสร้างสารประกอบฟีนอลิกเพื่อใช้ในระบบป้องกันตัวเองจากโรคและแมลง และเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดธาตุอาหาร พืชที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีการสะสมแอนโทไซยานินที่ใบ เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (ใน photosystem II) เมื่อเอนไซม์เหล่านั้นไม่สามารถทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้เต็มที่ จะทำให้เกิด photo damage คือ แสงที่ถูกดูดกลืนมาเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงมีมากเกินไปเอนไซม์จะเปลี่ยนไปให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตรายกับพืชได้ ดังนั้นพืชจึงสร้างแอนโทไซยานินขึ้นมาเพื่อปกป้องอันตรายจากแสง (Dugald and Christopher, 2001)

กวางเครือแดงเป็นพืชตระกูลถั่ว บุญร่วม คิคคำ (2547) พบไรโซเบียมที่บริเวณรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง ซึ่งไรโซเบียมจะสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่วได้ โดยไรโซเบียมจะเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากของพืชตระกูลถั่วในภาวะพึ่งพาซึ่งกันและกัน (symbiosis) เพื่อไรโซเบียมจะสามารถเข้าสู่รากพืชได้นั้นมีกลไก คือรากพืชจะปล่อยสารประกอบฟลาโวนอยด์ หรือไอโซฟลาโวนอยด์ออกมา สารเหล่านี้จะไปกระตุ้นให้ไรโซเบียมเคลื่อนตัวสู่รากพืชและกระตุ้นกลุ่มของยีนในเชื้อไรโซเบียมที่ควบคุมการสร้างปมให้มีการแสดงออกเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพวก lipopolysaccharide หรือเรียกว่า nod factor เชื้อไรโซเบียมจะปลดปล่อยสารนี้ออกสู่ภายนอกเซลล์ จากนั้น nod factor ก็จะทำให้รากของพืชตระกูลถั่ว นั้นโค้งงอและเปลี่ยนเป็นโครงสร้างของปมต่อไป ในช่วงนี้เชื้อไรโซเบียมก็จะเคลื่อนตัวเข้าสู่รากของพืชไปตามโครงสร้างที่เรียกว่า infection thread ซึ่งยีนในเซลล์ของรากพืชเป็นตัวแสดงออกเพื่อให้เกิดโครงสร้างนี้และโครงสร้างที่จะขยายตัวออกมาเป็นปมต่อไป (หนึ่ง เตีย อารุง และนันทกร บุญเกิด, 2539) Suzuki *et al.* (2006) รายงานว่า ไรโซเบียม *Bradryrhizobium japonicum* และ *Sinorhizobium fredii* ที่อาศัยอยู่บริเวณรากของต้นกล้าถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.) สามารถชักนำการสังเคราะห์ยีนของเอนไซม์ isoflavone conjugate-hydrolyzing β -glucosidase (ICHG) ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน free isoflavone ไปเป็น isoflavone conjugated เช่น genistein และ daidzein ได้ และจากการตรวจสอบ ICHG ในส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าถั่วเหลือง พบ ICHG เฉพาะบริเวณรากที่มี *B. japonicum* และ *S. fredii* อาศัยอยู่เท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยอยู่บริเวณรากของพืชตระกูลถั่วน่าจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการสะสมสารประกอบฟลาโวนอยด์ไว้ในรากได้

3.4 สรุปผลการวิจัย

การฉีดพ่นเอทีฟอนทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก และน้ำหนักสดของรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงแตกต่างกันทางสถิติ แต่ทำให้ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากและปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้มีความหนาเฉลี่ยของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงมากที่สุด คือ 3.96 และ 4.27 มิลลิเมตร และการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงมากที่สุด คือ 37.63 และ 40.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม น้ำหนักสด ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์มีผลต่อการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง 99.3% ($r^2 = 0.993$) ความเข้มข้นของเอทีฟอนมี

ผลต่อการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง 97.2% ($r^2 = 0.972$) และเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยอยู่บริเวณรากของพืชตระกูลถั่วอาจจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการสะสมสารประกอบฟลาโวนอยด์ไว้ในรากได้

3.5 รายการอ้างอิง

- เกษร เมืองทิพย์. (2549). พฤกษศาสตร์ พันธุ์ การเจริญเติบโต และการพัฒนาการติดฝักและเมล็ด และแอนโทไซยานินในกวางเครือแดง. **วิทยานิพนธ์ปริญญาคุณวุฒิบัณฑิต** สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- จามรี สิงห์แก้ว. (2550). ผลของ abscisic acid (ABA) abscisic acid analog (ABA) Ethephon และ aminoethoxyvinylglycin (AVG) ที่มีต่อสีผิวของแอปเปิ้ลพันธุ์ Tsugaru. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท** สาขาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จารุจินันท์ หล้ากวนวัน. (2549). ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมสาร phytoosterol ในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) และผลของสารนี้ต่อมดลูกของหนูขาวเพศเมีย (*Rattus norvegicus*). **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท** สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ชนาภรณ์ ศรีศิริพันธุ์ และคณะ. (2549). ผลของเอทีฟอนและกรดแอบไซซิกต่อปริมาณของแอนโทไซยานินและแอกทิวิตีของฟีนิลอะลานีนแอมโมเนีย-ไลเอส ในเปลือกผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 37: 5 (พิเศษ): 156-159.
- นิรนาม. (ม.ป.ป.). (ออนไลน์). ได้จาก <http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/2001/autumn.htm>
- บุญร่วม คิดคำ. (2547). อิทธิพลของสภาพแวดล้อม และการเขตกรรมต่อการเจริญเติบโต และการสะสมสารเคมีในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง (*Butea superba* Roxb.). **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท** สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- พีรเดช ทองอำไพ. (2537). **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์: แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย**. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 196 หน้า.
- วารุณี วงศ์ชมภู. (2543). ผลของแสงและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนีย-ไลเอส และการพัฒนาสีแดงในเปลือกมะม่วงพันธุ์เคนท์. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- วิโรจน์ เชาว์วิเศษ. (2550). ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของ กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdha และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของ หลอดเลือดหนูขาว (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชา เทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- หนึ่ง เตียอำรุง และนันทกร บุญเกิด. (2539). ความสัมพันธ์ระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว ในเชิงพันธุกรรมระดับโมเลกุล. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 3: 15-20.
- Avenant, J.H. and Avenant, E. (2006). **The effect of ethephon on anthocyanin of beery skin colour of crimson seedless and ebony startable grapes** [On-line]. Available: <http://www.actahort.org/members/showpdf>
- Ban, T., Kugishima, M., Ogata, T., Shiozak, S., Horiuchi, S. and Ueda, H. (2006). **Effect of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on the fruit ripening characters of rabbiteye blueberry** [On-line]. Available: <http://www.sciencedirect.com>
- Blankenship, S.M. and Unrath, C.R. (1988). PAL and ethylene content during maturation of 'Red' and 'Golden Delicious' apple. **Phytochem.** 27(4): 1001-1003.
- Camm, E.L. and Towers, G.H.N. (1973). Phenylalanine ammonia-lyase. **Phytochem.** 12: 961-973.
- De, J.H. 1991. Inheritance of anthocyanin pigmentation in the cultivated potato: a critical review. **Am. Potato J.** 68: 585-591.
- Dugald, C.C. and Christopher, L.B. (2001). The Ecophysiology of Foliar Anthocyanin. **The Botanical Review.** 69(2): 149-161.
- Farag, K.M., Palta, J.P. and Stang, E.J. (2004). Ethanol enhances the effectiveness of ethephon on anthocyanin production in cranberry fruits in the field. **Hort. Science.** 27(5): 411-412.
- Francis, F.J. (1982). Effectiveness of ethephon on anthocyanin production in cranberry fruits in the field. **Hort. Science.** 27: 411-412.
- Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. (2000). **Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy.** Current protocols in food analytical chemistry. New York: Wiley.
- Gutterson, N. (1995). Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression. **Hort. Science.** 30: 964-966

- Jeong, S.T., Yamamoto, G.N., Kobayashi, S and Ekasa, M. (2004). Effect of plant hormones and shading on accumulation of anthocyanin and expression of anthocyanin biosynthesis genes in grape berry skins. **Plant Sci.** 167: 247-252.
- Karim, M. F. and Hassan A.K. (1998). **Accelerating and intensifying color formation of zaghoul date palm fruit using modified ethephon formulations** [On-line]. Available: http://www.pubhort.org/datepalm/datepalm1/datepalm1_4.pdf
- Li, Z.H., Sugaya, S., Gemma, H. and Iwahori, S. (2002). Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus-calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis. *Scientia Horticulture*. 94: 193-199.
- Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). **SPSS Programming and Data Management** (3rd ed.). United State of America: SPSS Institute.
- Mattheis J.P., Rudell, D.R and Buchanan D.A. (2006). **Ethylene intensifies but is not a requirement for methyl jasmonate-enhanced anthocyanin synthesis by 'Fuji' apple** [On-line]. Available: www.patentstorm.us/patents/5126155-description.html.
- Mohamed, A. and Gahni, A. (2001). **The apple skin colourful healthiness-Developmental and environmental regulation of flavonoids and chlorogenic acid in apples** [On-line]. Available: <http://library.wur.nl/wda/abstracts/ab3012.html>
- Nakamura, Y., Hidaka, M., Masaki, H., Seto, H. and Uozumi, T. (1990). Major anthocyanin of the flowers of Hibiscus (*Hibiscus rosasinensis* L.). **Agriculture and Biological Chemistry**. 54: 3345-3346.
- Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.S., Tang, Y., Liu, C.J. and Dixon R.A. (2007). **Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signal in Medicago truncatula** [On-line]. Available: pas.org/cgi/doi/pnas.0708697104.html
- Ohmiya, A. (2000). Effect of auxin on growth and ripening pericarp discs of peach fruit. **Sci. Hort.** 84: 309-319.
- Sarah, G. and Lawes, G.S. (1999). **Improving Apple Color** [On-line]. Available: <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pgDisplay.php?article=RP2000A>
- Stafford, H.A. (1990). **Flavonoid metabolism**. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 93-98.
- Sherma, J. and Fried, B. (2003). **Handbook of Thin Layer Chromatography**. New York: Marcel Dekker. PP. 1104-1125.

- Suzuki, H. (2006). An Isoflavone Conjugate-hydrolyzing β -glucosidase from the Roots of Soybean (*Glycine max*) Seedlings. **The journal of biological chemistry**. 281(40): 30251-30259.
- Wrolstad, R.E., Robert, W.D. and Jungmin, L. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in food science and technology**. 16: 423-428.
- Young, A. and Britton, G. (1993). **Carotenoids in photosynthesis.**, London: Chapman & Hall. PP. 106-120.

บทที่ 4

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดง (*Butea superba* Roxb.)

บทคัดย่อ

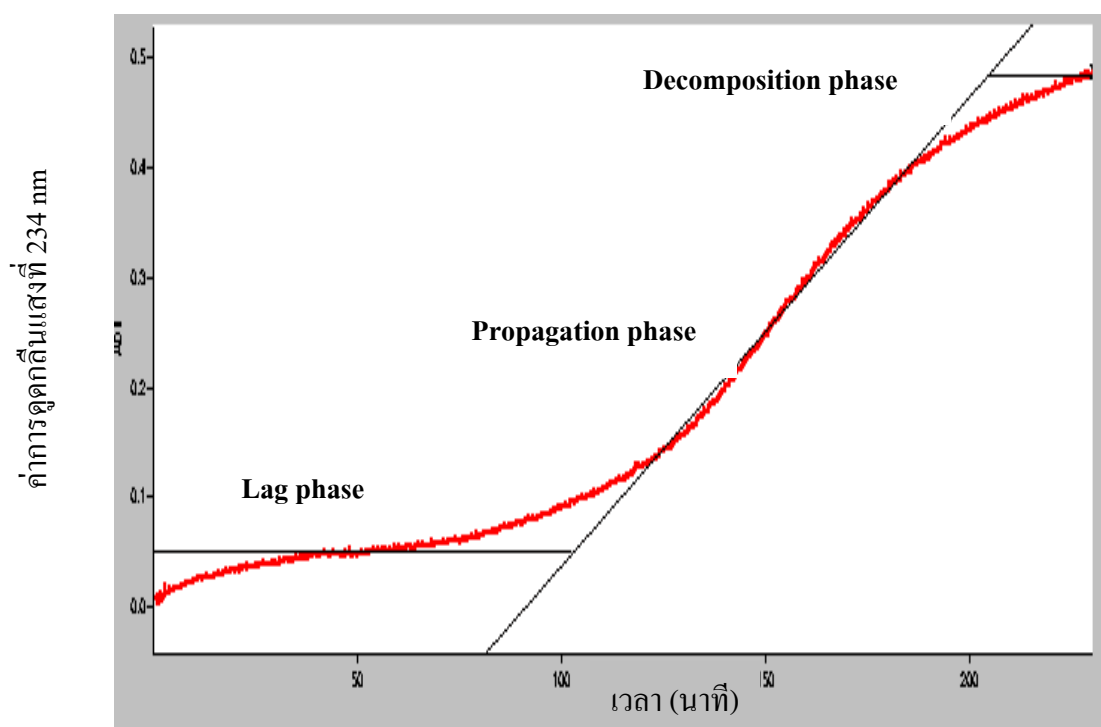
รากสะสมอาหารของกวางเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) มีสารออกฤทธิ์สำคัญหลายกลุ่มรวมทั้งแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดง 3 วิธี คือ DPPH, ABTS และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ในหลอดทดลอง โดยใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี ได้วางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ 5 ทริตเมนต์ คือ สารสกัดกวางเครือแดงที่ได้รับการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 0 (ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น), 100, 200, 300 และ 400 ppm ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า IC_{50} จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ พบว่าค่า IC_{50} มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า IC_{50} จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ trolox โดยใช้วิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ trolox และได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของ lag time ของสารสกัดทั้ง 5 ทริตเมนต์ พบว่า lag time แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้นานที่สุด และจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของ lag time ของสารสกัดกวางเครือแดง 5 ทริตเมนต์ และ trolox เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัดกวางเครือแดง) โดยวิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ และ trolox มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้นานกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สรุปได้ว่าสารสกัดกวางเครือแดงที่ได้รับการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

4.1 บทนำ

กาวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) เป็นพืชที่มีการใช้เป็นยาสมุนไพรมาแต่โบราณ ราก สะสมอาหารของกาวาวเครือแดงมีสารออกฤทธิ์สำคัญหลายกลุ่มรวมทั้งแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (เกษร เมืองทิพย์, 2549) แอนโทไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุได้ อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสาร หรือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอน โคคเดี่ยว (unpair electron) อยู่รอบนอก เป็น โมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำลายดีเอ็นเอ ไขมัน โปรตีน และเซลล์ ก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของอวัยวะในร่างกาย ส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคความดันสูง โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง และ โรคอัลไซเมอร์ (Wang *et al.*, 1996; Sawa *et al.*, 1999; Shrikhande, 2000; Rodrigo and Rivera, 2002; Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999) ในปัจจุบัน มนุษย์ป่วยด้วยโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ เพิ่มมากขึ้น การบริโภคหรือใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและ ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคดังกล่าวได้ (เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุด, 2547)

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น DPPH radical scavenging assay (DPPH), ABTS free radical dechlorization assay (ABTS), Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) และ Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) เป็นต้น แอนโทไซยานินที่สกัดได้จากรากสัพเบอร์รี่ มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการวัด ด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 5.10 mmol/100 กรัม น้ำหนักสด (Miller *et al.*, 2000) วิธี ABTS เท่ากับ 1.85 mmol/100 กรัม น้ำหนักสด (Proteggente *et al.*, 2002) แอนโทไซยานินที่สกัดได้จากเชอร์รี่มีค่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการวัดด้วยวิธี ORAC เท่ากับ 1.8 mmol ของ trolox /100 กรัม น้ำหนักสด วิธี ABTS เท่ากับ 2.7 mmol ของ trolox /100 กรัม น้ำหนักสด (Blando *et al.*, 2004) วิธีเหล่านี้สามารถกำจัดอนุมูลอิสระสังเคราะห์ได้ การรับประทานผักและผลไม้ที่มีแอนโทไซยานินสามารถยับยั้งการลุกลามของเนื้องอก ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และลดระดับไขมันใน เลือดได้ (Wrolstad, 2001) แอนโทไซยานินที่สกัดได้จากผลเชอร์รี่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อน เพิ่มการสร้างอินซูลิน (insulin) ที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้ (Nair, 2004) และ แอนโทไซยานินสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ได้ (Rottmann *et al.*, 2002; Morrissey *et al.*, 2004; Benito *et al.*, 2007) ปฏิกิริยา LDL oxidation แบ่งออกเป็น 3 ระยะ (ภาพที่ 4.1) คือ 1) ระยะ เริ่มต้นการสร้าง conjugated diene (CD) เรียกว่า lag phase 2) ระยะเพิ่มปริมาณการสร้าง CD เรียกว่า propagation phase และ 3) ระยะการสลายตัวของ CD เรียกว่า decomposition phases (Young and McEncny, 2001)

การเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเกิด LDL oxidation ใช้ lag time เป็นเกณฑ์ หาก lag time ยาวนาน หมายถึง สารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้สูง



ภาพที่ 4.1 ปฏิกิริยา LDL oxidation แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ 1) ระยะเริ่มต้นการสร้าง CD (lag phase) 2) ระยะเพิ่มปริมาณการสร้าง CD และ 3) ระยะการสลายตัวของ CD (decomposition phase) (Young and McEneny, 2001)

แอนโทไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีแนวโน้มนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันและรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้

4.2 วิธีดำเนินการวิจัย

4.2.1 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาการผลิตพืชเทคโนโลยี อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 (F3) และห้องปฏิบัติการชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2 (F2) ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551

4.2.2 กลุ่มตัวอย่าง วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

สารสกัดกวางเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบ (จากการทดลองที่ 1) จำนวน 5 ทริตเมนต์ ดังนี้

ทริตเมนต์ที่ 1 (T1) สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น

ทริตเมนต์ที่ 2 (T2) สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm

ทริตเมนต์ที่ 3 (T3) สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200 ppm

ทริตเมนต์ที่ 4 (T4) สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 ppm

ทริตเมนต์ที่ 5 (T5) สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 400 ppm

4.2.3 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ทิพรัตน์ หงส์ภักดิ์, 2548)

การเตรียมสารละลาย DPPH ในเอทานอล (DPPH solution) ความเข้มข้น 0.08 mM แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

วิธีการทดสอบ

เจือจางสารสกัดกวางเครือแดงจากการทดลองที่ 1 ทุกทริตเมนต์ด้วยเมทานอล ใส่สารสกัดกวางเครือแดงที่เจือจางแล้ว (ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) 1.5 ml ทำปฏิกิริยากับ DPPH solution 1.5 ml ในที่มืด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ใช้เอทานอล 100% ผสมกับเมทานอลเป็น blank ใช้ DPPH solution ที่ไม่เติมสารสกัดกวางเครือแดงเป็นกลุ่มควบคุม และใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แล้วคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ (Sandoval *et al.*, 2002) ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

$$\% \text{Inhibition} = \text{เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH}$$

$$A_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่มีสารที่นำมาทดสอบ}$$

คำนวณหาความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ทำได้โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50% (ทิพรัตน์ หงส์ภักดิ์, 2548; Choavanalikit, 2004)

4.2.4. การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS free radical decolorization assay

(Miller and Rice-Evan, 1997)

การเตรียมสารละลาย ABTS (ABTS⁺ solution) โดยผสมสารละลาย ABTS 7 mM กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 mM แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง 12-16 ชั่วโมงก่อนใช้ (เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้สมบูรณ์) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm

วิธีการทดสอบ

เจือจางสารสกัดกาวเครือแดงจากการทดลองที่ 1 ด้วยเมทานอลทุกทริตเมนต์ ใส่สารสกัดกาวเครือแดงเจือจางแล้ว (ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/100 ml) 0.1 ml ให้ทำปฏิกิริยากับ ABTS⁺ solution 2.9 ml ในที่มืด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ใช้เมทานอลผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น blank ใช้ ABTS⁺ solution ที่ไม่เติมสารสกัดกาวเครือแดงเป็นกลุ่มควบคุม และใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แล้วคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ (Miliauskas *et al.*, 2003) และคำนวณหาค่า IC₅₀

4.2.5. การวัดฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ

(low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ในหลอดทดลอง (Ambra *et al.*, 2006)

การเตรียม LDL ใช้ LDL สำเร็จรูปของมนุษย์ (LDL ในรูปผง จากบริษัท sigma) และเตรียม stock LDL 50 µg/ml (เก็บรักษาที่ 4°C)

วิธีการทดสอบ

1. ใช้ LDL 100 µg/ml ชักนำไปให้เกิด LDL oxidation ด้วย CuSO₄ 20 µg/ml ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ที่มากเกินไป
2. เติมสารสกัดแอนโทไซยานิน 1 µM (final concentration) ทุกทริตเมนต์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm (เพื่อวัดการดูดกลืนแสงของ conjugated diene (CD) ที่จะเกิดขึ้นเมื่อเกิด LDL oxidation)
3. ใช้ปฏิกิริยาที่เติมเมทานอล, PBS และน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น blank ใช้ปฏิกิริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมแอนโทไซยานินเป็นกลุ่มควบคุม และใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเกิด LDL oxidation

การเกิด LDL oxidation แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ 1) ระยะเริ่มต้นการสร้าง CD (lag phase) 2) ระยะเพิ่มปริมาณการสร้าง CD และ 3) ระยะการสลายตัวของ CD (decomposition phase) (Young and McEneny, 2001) การเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเกิด LDL oxidation ใช้ lag time เป็นเกณฑ์ หาก lag time ยาวนานหมายถึงมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL

oxidation ได้สูง ซึ่ง lag time หาได้จากกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และเวลาที่ทำปฏิกิริยา (นาที) ซึ่งหาได้จากจุดตัดของการลากเส้นสัมผัสของ lag phase และ propagation phase (Frank *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006) (วิธีหา lag time แสดงในภาพผนวกที่ 18)

4.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v. 13 for window (Levesque and SPSS Inc., 2006) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยค่า IC_{50} และ lag time ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ตรีตเมนต์จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS โดยใช้วิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ตรีตเมนต์ กับ trolox และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ lag time ของการเกิด LDL oxidation จากการทดสอบด้วยสารสกัดกวางเครือแดง 5 ตรีตเมนต์ และ trolox กับกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ independent sample t-test

4.3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.3.1 ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

วิธี DPPH ใช้ในการวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้หลักการ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว และดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm เมื่อผสมอนุมูลอิสระ DPPH[•] และสารสกัดกวางเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบในหลอดทดลอง หมู่ไฮดรอกซีที่เกาะอยู่บริเวณหมู่ -R ของ aromatic ring ในโครงสร้างแอนโทไซยานินสามารถจับกับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ (โครงสร้างของแอนโทไซยานินในภาพที่ 2.2) เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้รับโปรตอนก็จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง แล้วคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 6) และคำนวณค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงของกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกวางเครือแดงและ trolox กับเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ภาพผนวกที่ 5-10)

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ตรีตเมนต์ (T1-T5) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ด้วยวิธี DMRT พบว่า มีค่า IC_{50} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การทดสอบด้วยสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ต่ำที่สุด (66.25 และ 66.67 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับสารสกัดกวางเครือแดงที่ไม่ฉีดพ่นเอทีฟอน (84.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$) และสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm และ 200 ppm (85.82 $\mu\text{g}/100$ และ 69.91 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) สารสกัดกวางเครือแดงที่ไม่ฉีดพ่น และฉีดเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกัน แต่สาร

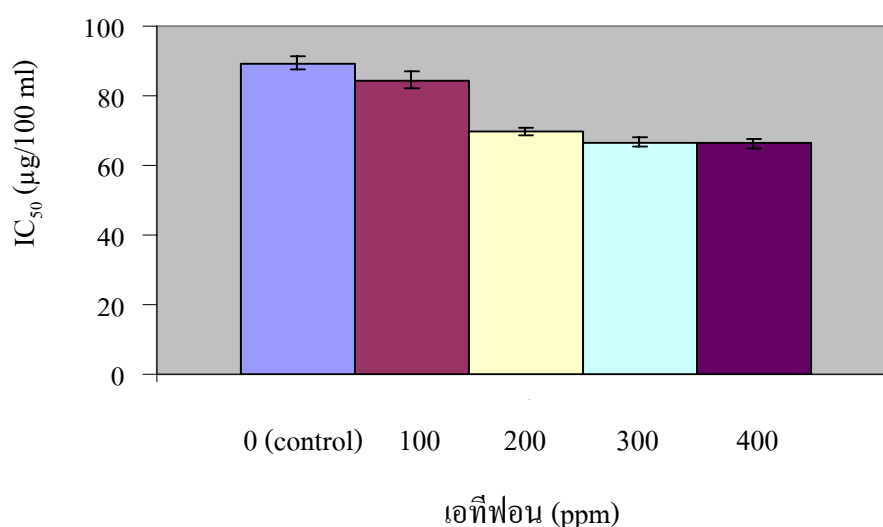
สกัดกาวเครือแดงที่ไม่ฉีดเอทีฟอนแตกต่างกับการฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 200 ppm (ภาพที่ 4.2 และ ตารางภาคผนวกที่ 8 และ 9) การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} ของสารสกัดกาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ กับ trolox ด้วยการวิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัดกาวเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างทางสถิติกับ trolox (65.11 $\mu\text{g/ml}$) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของ trolox กับสารสกัดกาวเครือแดง 5 ทริตเมนต์ จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

กลุ่มทดลอง	IC_{50} ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)
trolox	65.11 \pm 2.33
T1	89.28 \pm 1.81**
T2	84.48 \pm 2.46**
T3	69.91 \pm 1.13*
T4	66.67 \pm 1.49
T5	66.25 \pm 1.44

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 5%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 1%



ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของสารสกัดกาวเครือแดง 5 ทริตเมนต์ จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (I = SD)

สารสกัดควาวเครือแดงสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ และมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 66-89 µg/100 ml (หรือ 0.66-0.89 µg/ml) ค่า IC₅₀ เป็นดัชนีที่ใช้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้จากค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50% นฤภัทร ฤทธิ์นภา และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดลูกหว่า ด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของลูกหว่า มีค่า IC₅₀ 517.5, 1,345.83 และ 269.9 µg/ml Chung *et al.* (2004) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ E. Walther (*Graptopetalum paraguayense*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนที่มีใบสีเขียวปนแดง ด้วยวิธี DPPH พบว่ามีค่า IC₅₀ 165 µg/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐาน คือ trolox (40 µg/ml) และ Bae and Suh (2006) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากผลหม่อน 5 พันธุ์ พบว่ามีค่า IC₅₀ 59-118 µg/ml จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินของลูกหว่า และสารสกัดแอนโทไซยานินของผลหม่อนกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบด้วยวิธี DPPH พบว่า ค่า IC₅₀ ของสารสกัดควาวเครือแดง มีค่า IC₅₀ ต่ำกว่าสารสกัดจากลูกหว่า สารสกัดจากใบ E. Walther และสารสกัดแอนโทไซยานินของผลหม่อน แสดงว่าสารสกัดควาวเครือแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากลูกหว่าและสารสกัดแอนโทไซยานินของผลหม่อน

4.3.2 ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS free radical decolorization assay

วิธี ABTS เป็นการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ มีหลักการคล้ายกับวิธี DPPH คือ สร้างอนุมูลอิสระที่มีสีขึ้น โดยสร้างอนุมูลอิสระจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS กับ oxidizing agent คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อ ABTS ถูกออกซิไดซ์ (oxidized) ด้วย oxidizing agent จะเกิด ABTS free radical (ABTS^{•+}) สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการนำมาทดสอบจะขจัด ABTS^{•+} ที่เกิดขึ้น แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm (เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2547) โดยหากค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากหรือสีของสารละลายจางลงมากจะแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (อนุพงษ์ ศิริเมืองมูล และคณะ, 2547) การคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ (ตารางภาพผนวกที่ 7) และคำนวณค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรงของกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดแอนโทไซยานินและ trolox กับเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ภาพผนวกที่ 11-16)

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดควาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ ด้วยวิธี DMRT พบว่ามีค่า IC₅₀ ต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การทดสอบด้วยสารสกัดควาวเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มี

ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ต่ำที่สุด (43.24 และ 46.30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างกับสารสกัดกวางเครือแดงที่ไม่ฉีดพ่นเอทีฟอน (100.12 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$), สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm (98.16 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) และ 200 ppm (82.69 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) ซึ่งการทดสอบด้วยสารสกัดแอนโทไซยานิน จาการากสะสมอาหารของกวางเครือแดงที่ไม่ฉีดพ่นและฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับการทดสอบด้วยสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200 ppm (ภาพที่ 4.3)

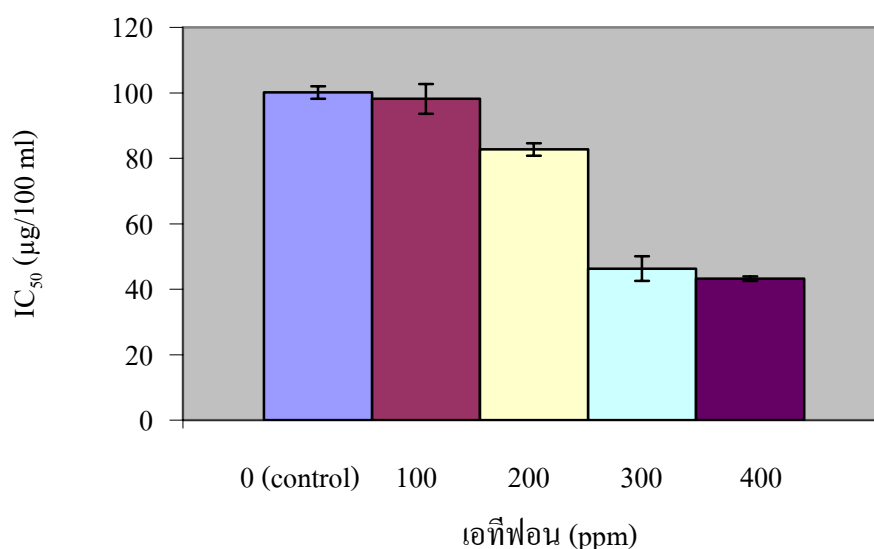
การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ได้ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ กับ trolox ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ independent sample t-test พบว่า สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างทางสถิติกับ trolox (41.46 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) (ตารางที่ 4.2 และตารางภาคผนวกที่ 8 และ 9) แสดงว่าสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกับ trolox

สารสกัดกวางเครือแดงสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ได้ และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 43-100 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ จากการตรวจเอกสาร พบว่า การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS นิยมใช้ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ที่มีหน่วยเป็นกรัมของ trolox ต่อกรัมของสารสกัด เป็นดัชนีวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แต่การทดลองครั้งนี้ใช้ค่า IC_{50} ซึ่งเป็นดัชนีที่ใช้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถบอกความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงได้เช่นกัน

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ของการทดสอบด้วย trolox กับสารสกัดจาการากสะสมอาหารของกวางเครือแดง 5 ทริตเมนต์ ด้วยวิธี ABTS

กลุ่มทดลอง	IC_{50} ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
trolox	41.46 \pm 1.89
T1	100.12 \pm 1.92**
T2	98.16 \pm 4.54**
T3	82.69 \pm 1.94
T4	46.30 \pm 3.76
T5	43.24 \pm 0.66

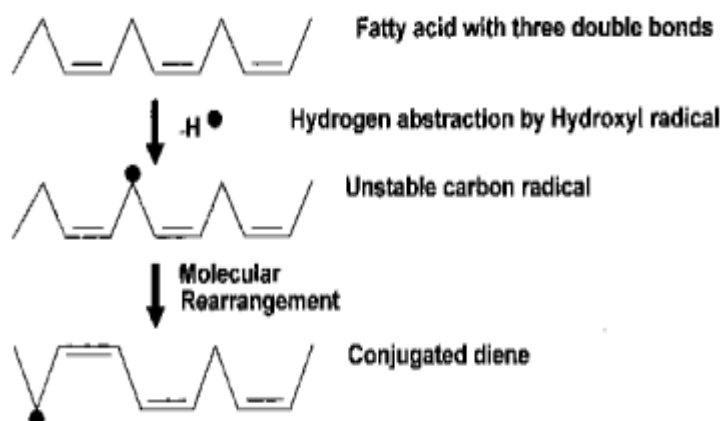
**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 1%



ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC₅₀ ของสารสกัดกวางเครือแดง 5 ทริตเมนต์ ของการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (I = SD)

4.3.3 ผลการวัดฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ในหลอดทดลอง

กลไกของการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation คือ เมื่อพันธะคู่ในโครงสร้างของ LDL (เป็น fatty acid ชนิดหนึ่ง) ถูกอนุมูลอิสระแย่งอิเล็กตรอนไป จะทำให้โครงสร้างของ fatty acid อยู่ในสภาวะที่ไม่เสถียร ทำให้เกิดการดึงอิเล็กตรอนจาก LDL โมเลกุลอื่นมาทดแทนส่วนที่สูญเสียไป แล้วเกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ไปเป็น conjugated diene หรือเข้าสู่ภาวะการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation (แสดงในภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation (ที่มา: Young and McEneny, 2001)

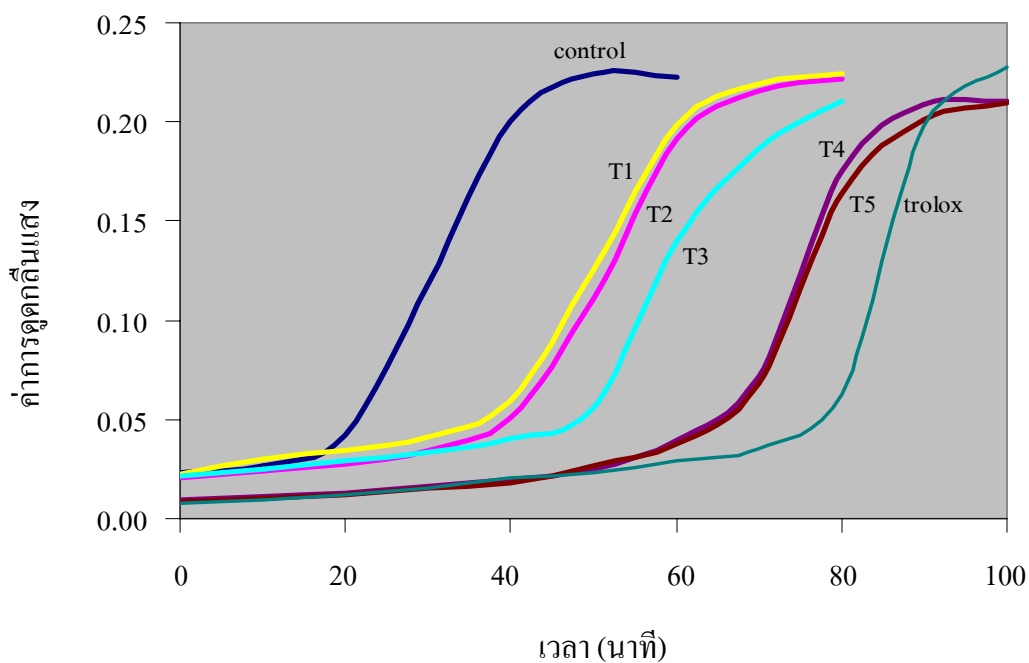
การเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ในร่างกายมนุษย์ทำให้มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (Young and McEneny, 2001) มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ซึ่งกลไกของการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation คือ สารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถให้โปรตอนแก่โมเลกุลของ LDL ที่สูญเสียอิเล็กตรอนไป (อิเล็กตรอนเดี่ยว) ทำให้ LDL อยู่ในภาวะเสถียร และไม่เกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ไปเป็น conjugated diene

การเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ และ trolox ได้เข้าสู่ lag phase และ propagation phase ภายในเวลา 100 นาที แล้วหลังจากนั้นจะเข้าสู่ decomposition phase หรือช่วงสลายตัวของ CD (ภาพที่ 4.5 และตารางผนวกที่ 10) ทำการคำนวณหา lag time จากจุดตัดของเส้นสัมผัสของ lag phase และเส้นสัมผัสของ propagation phase (วิธีหา lag time ในภาพผนวกที่ 12) การวัดฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation ของการทดสอบด้วยสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ ด้วยวิธี DMRT พบว่า ทั้ง 5 ทริตเมนต์มี lag time แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้นานที่สุด (57.41 และ 59.03 นาที) (ภาพที่ 4.6 และตารางภาคผนวกที่ 8 และ 9) และจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของ lag time ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ และ trolox เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยวิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ และ trolox มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้นานกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.3)

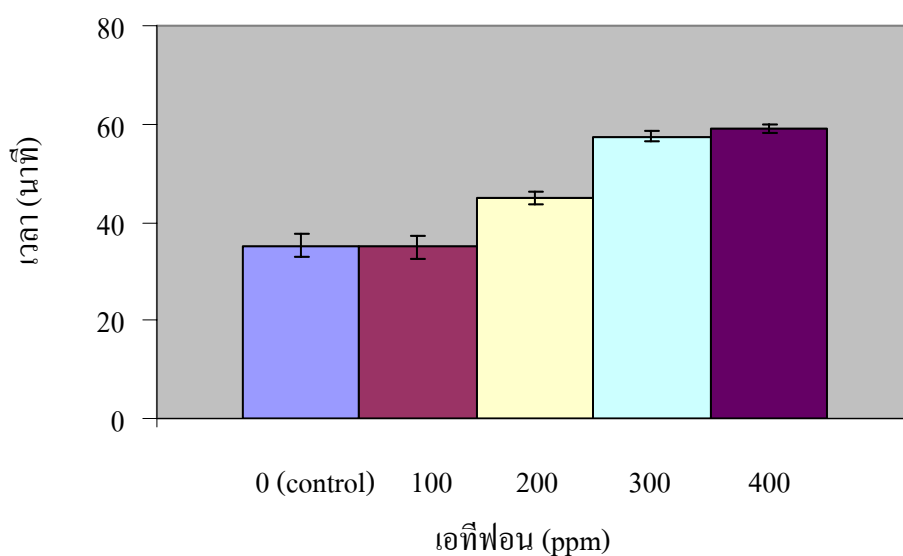
ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ lag time ของการใช้สารสกัดกวางเครือแดง และ trolox กับกลุ่มควบคุมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation

กลุ่มทดลอง	lag time (นาที)
กลุ่มควบคุม	15.85 ± 1.44
trolox	68.26 ± 1.00**
T1	35.25 ± 2.49**
T2	34.99 ± 2.38**
T3	45.03 ± 1.36**
T4	57.41 ± 1.15**
T5	59.03 ± 0.98**

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 1%



ภาพที่ 4.5 แสดงการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมสารสกัดกาวเครือแดง (control) เติมสารสกัดกาวเครือแดงที่ไม่ฉีดพ่นเอธิฟอน (T1), ฉีดพ่นเอธิฟอน 100 ppm (T2), ฉีดพ่นเอธิฟอน 200 ppm (T3), ฉีดพ่นเอธิฟอน 300 ppm (T4), ฉีดพ่นเอธิฟอน 400 ppm (T5), trolox และปฏิกิริยา LDL oxidation ที่อุณหภูมิ 37 °C ในเวลา 0 ถึง 100 นาที



ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย lag time ของสารสกัดกาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ (I = SD)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ในหลอดทดลองของสารสกัด กวาวเครือแดง มี lag time ในช่วง 35-59 นาที Rottmann *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง ปฏิกิริยา LDL oxidation ในหลอดทดลองของสารสกัดแอนโทไซยานินจากผล ach (*Aritotelia chilensis*) พบว่า สารสกัดจากผล ach มี lag time 250 นาที ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกลุ่ม ควบคุม (110 นาที) Yen *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation ในหลอด ทดลองของสารสกัดของ Haw fruit (*Opuntia dillenii*) พบว่า สารสกัดของ Haw fruit มี lag time เท่ากับ 236 นาที ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกลุ่มควบคุม (154 นาที) แม้ว่าการทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ในหลอดทดลองของสารสกัดกวาวเครือแดงมี lag time สั้นกว่า สารสกัดแอนโทไซยานินจากผล ach และสารสกัดของ Haw fruit แต่จากการเปรียบเทียบ lag time ของสารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ กับกลุ่มควบคุม พบว่า lag time ของสารสกัดกวาวเครือ แดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารสกัด กวาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ใน หลอดทดลองได้ แต่ปัจจัยอื่น ๆ อาจเป็นสาเหตุให้ lag time สั้น เช่น การใช้ LDL สำเร็จรูปซึ่งเป็น LDL ที่มีความบริสุทธิ์สูง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ในอัตราที่ต่ำ จึงทำให้ lag time สั้น

4.4 สรุปผลการวิจัย

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัด กวาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ด้วยวิธี DMRT พบว่า สารสกัด กวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอน 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} เท่ากับ 66.25 และ 66.67 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ตามลำดับ) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} ของ สารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์กับ trolox ด้วยวิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัด กวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอน 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ trolox (ค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ trolox เท่ากับ 65.11 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$)

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัด กวาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ด้วยวิธี DMRT พบว่า สารสกัด กวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอน 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ IC_{50} เท่ากับ 43.24 และ 46.30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ตามลำดับ) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า IC_{50} ของ สารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์กับ trolox ด้วยวิธี independent sample t-test พบว่า สารสกัด กวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอน 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ trolox (ค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ trolox เท่ากับ 41.43 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$)

การวัดฤทธิ์การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของการทดสอบด้วยสารสกัด กวาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ lag time ด้วยวิธี DMRT พบว่า สารสกัดกวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นเอทีฟอน 300 และ 400 ppm สามารถยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation ได้ยาวนานที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ lag time เท่ากับ 57.41 และ 59.03 นาที)

การวัดฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ lag time ของ การวัดฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวาวเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ และ trolox กับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มควบคุมมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation สั้นที่สุด (ค่าเฉลี่ยของ lag time เท่ากับ 15.85 นาที) สารสกัดกวาวเครือแดง และ trolox สามารถยับยั้ง ปฏิกิริยา LDL oxidation ได้ยาวนานกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

4.5 รายการอ้างอิง

- เกษร เมืองทิพย์. (2549). พฤกษศาสตร์ พันธุ์ การเจริญเติบโต และการพัฒนาการติดฝักและเมล็ด และแอนโทไซยานินในกวาวเครือแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุด. (2547). การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ สารสกัดกระชายดำและน้ำหมักชีวภาพที่สกัดจากกระชายดำ [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_R10003-47.pdf.
- นุชนิภา นันทะวงศ์, อัญธิกา นามมูลตรี และเจตระวี ต๊ะเงิน. (2548). การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพืชพื้นบ้าน [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thaiscience.info/Article%ThaiScience/Article/5/plant.pdf>
- จิตตินันท์ ม่วงจีน, วรินทร์ ชวศิริ และสลิลทิพย์ ประเทืองสุขศรี. (2549). การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารในกลุ่มไฮโดรควิโนน [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thaiScience.info/Article%20for%20ThaiScience/Article/%compound.pdf>
- ชัยยันต์ บุญยี่น, อรนาถ สุนทรวัฒน์ และรัศมี ชัยสุขสันต์. (2549). การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพิกุล [ออนไลน์]. ได้จาก: www.scisoc.or.th/st/32/sec_c/paper/stt32_C1_C0010.pdf
- ทิพรัตน์ หงส์ภัทรศิริ. (2548). รายงานวิจัย เรื่องการศึกษาและพัฒนาคุณสมบัติในกำจัดอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ไวน์ผลไม้โดยใช้สมุนไพรและเครื่องเทศ. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

- นฤภัทร ฤทธิชัย และหิรัญ สุวรรณทิ. (2550). ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดลูกหว่า. *ว. วิทย. กษ.* 38: 5 (พิเศษ): 63-65.
- อนุพงษ์ ศิริเมืองมูล และคณะ. (2547). ผลของการแปรรูปโดยใช้ความร้อนต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมะเขี๋ยง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Ambra, R., Fuchs, D. Pascual-Teresa, S., Rimbach, G., Fabio V. and Wenze, U. (2004). Proteome analysis for identification of target proteins of genistein in primary human endothelial cells stressed with oxidized LDL or homocysteine. **European Journal of Nutrition.** 95: 23-28.
- Bae, S.H. and Suh, H.J. (2006). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. **LWT.** 40(2007): 955-962.
- Benito, S., Buxaderas, S. and Mitjavila, M.T. (2007). Flavonoid metabolites and susceptibility of rat lipoproteins to oxidation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 287: 2819-2824.
- Blando, F., Gerardi, C. and Nicoletti, I. (2004). Sour Cherry (*Prunus cerasus* L) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 5(2004): 253-258.
- Blumberg, J. and Block, G. (1994). The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer preventing study in Finland. **Nutr. Rev.** 52: 242-245.
- Chang, Y.C., Huang, K.X., Huang, A.C., Ho, Y.C. and Wang, C.J. (2006). *Hibiscus* anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. **Food and Chemical Toxicology.** 44(7): 1015-1023.
- Chaovanalikit, A. (2004). Anthocyanins, total phenolics, and antioxidant capacity of bluehoneysuckles. **In Abstracts and A CD articles of The 30th Congress on Science and Technology of Thailand**, October 19-21, 2004. Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thang Thani, Bangkok, Thailand.
- Chang, Y.C., Chen, S.J., Hsu, C.K., Chang, C.T. and Chou, S.T. Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. **Food Chemistry.** 91(2005): 419-424.
- Demacker P.N., Hijmans A.G., Breninkmeijer B.J., van't Laar A. (1984) Five methods for determining low-density lipoprotein compared. **Clin. Chem.** 30: 1797-1800.

- Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. **Free Rad. Res. Commun.** 6: 67-75.
- Greenrod, W.H., Darby K. and Fyfe J.D. (2007). **Copper (Cu²⁺)-mediated oxidation of low density lipoprotein (LDL) using the Cary 100 Biospectrophotometer with WinUV Biosoftware** [On-line]. Available: <http://www.varianinc.com.cn/products/spectr/uv/atworks/uv83.pdf>
- Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). **SPSS Programming and Data Management** (3rd ed.). United State of America: SPSS Institute.
- Morrissey, M.T., Rasmussen, R. and Okada, T. (2004). Mercury Content in Pacific Troll-Caught Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*). **Journal of Aquatic Food Product Technology.** 13(4): 41-52.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Beek, T.A. (2003). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry.** 85(2): 231-237.
- Miller, N.J. and Paganga, G. (1998). Antioxidant activity of low density lipoprotein. In **Free radical and antioxidant protocols.** Totowa, NJ: Human Press. 108: 225-235.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radicle diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. **J. Sci. Technol.** 26(2): 211-219.
- Moore K., Roberts L.J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. **Free Radic Res.** 28(6): 659- 671.
- Nair, M. (2004). **Chemicals Found In Cherries May Help Fight Diabetes** [On-line]. Available: <http://www.sciencedaily.com/releases/2004/12/041220122203.htm>
- Parthasarathy S., Rankin S.M. (1992) Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. **Prog. Lipid Res.** 31: 127-143.
- Pederson, H., Petersen, M., Jensen, T. and Nielsen, N.S. (2003). Influence of fish oil supplementation on in vivo and in vitro oxidation resistance of low density lipoprotein in type 2 diabetes. **Eur. J. Clin. Nutr.** 57: 713-720.
- Pinelo, M., Landbo, A.K., Vikbjerg, A.F. and Meyer, A.S. (2006). **J. Agric. Food Chem.** 54(18): 6564-6571.

- Proteggente, A.R. et al. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruits and vegetables reflect their phenolic. **Free radical research**. 36: 217-233.
- Rottmann, S.M., Augusto, A., Druso, D., Alvado, L.F. and Leighton, F. (2002). Juice and phenolic fractions of the berry inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. **Food Chem**. 70(2): 2-7.
- Rodrigo, R. and Rivera, G. (2002). Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Rad. Biol. Med**. 33: 409-422.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N. Glories, Y. and Vivas, N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Res. Int**. 32: 327-333.
- Sandoval, M., Okuhama, N. N., Zhang, X. J., Condezo, L. A., Lao, J., Angeles, F. M., Musah, R. A., Bobrowski, P., and Miller M. J. S. 2002. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**. 9: 325-337.
- Sawa, T. Nakao, M. Akaike, T. Ono, K. and Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the antitumor-promoter effect of vegetables. **J. Agric. Food Chem**. 47: 397-402.
- Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. **Food Res. Int**. 33: 469-474.
- Steinburg D. (1997). Low density lipoprotein and its pathobiological significance. **J. Biol. Chem**. 272: 20963-20966.
- Wang, H. Cao, G. and Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem**. 10(44): 701-705.
- Wrolstad, R.E. (2001). **The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigments and Polyphenolics** [On-line]. Available: <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>.
- Yen, G.C., Chang, S.F. and Hsieh C.L. (2007). The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. **Food Chemistry**. 106(2008): 569-575.
- Young, I.S. and McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. **Biochemical Society Transactions**. 29(2): 358-362.

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) ด้วยเอทีฟอน

5.1.1 การเจริญเติบโตทางลำต้นและรากของกวาวเครือแดง

การฉีดพ่นเอทีฟอนที่ทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก ความยาวราก และน้ำหนักสดของรากเพิ่มขึ้น แต่การฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงสูงที่สุด

5.1.2 ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง

การฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงเพิ่มขึ้นได้ โดยการฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 และ 400 ppm ทำให้ความปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดงสูงที่สุด

5.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.)

5.2.1 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี ABTS free radical decolorization assay

จากการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดกวาวเครือแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารสกัดกวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ trolox พบว่า สารสกัดกวาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน 300 และ 400 ppm มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox

5.2.2 การวัดฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเจนของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ

(low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ในหลอดทดลอง

สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดด้วยเอทีฟอนทุกความเข้มข้น และ trolox สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้ยาวนาน ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (การเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมสารสกัดกวางเครือแดง) และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทริตเมนต์ พบว่า สารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอน 300 และ 400 ppm สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ได้ยาวนานที่สุด

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การฉีดพ่นเอทีฟอน

ควรฉีดพ่นเอทีฟอน 3 ระยะ ตามการเจริญเติบโตของกวางเครือแดง คือ ระยะใบอ่อน ระยะใบอ่อนถึงใบเปสลาด ระยะใบเปสลาด มีแนวโน้มว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของเอทีฟอนที่ฉีดพ่นให้กวางเครือแดง (มากกว่า 400 ppm) อาจทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวางเครือแดงเพิ่มขึ้นได้อีก ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาความเข้มข้นของเอทีฟอนที่เหมาะสมที่จะสามารถเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินได้สูงที่สุด และควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นที่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของกวางเครือแดงควบคู่ไปกับการเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานิน เพื่อเป็นการเพิ่มทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตกวางเครือแดง

5.3.2 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดง

ควรมีการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดกวางเครือแดงในการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ในหลอดทดลอง เพื่อเป็นแนวทางการใช้สารสกัดกวางเครือแดงในการต้านอนุมูลอิสระให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ANOVA ของเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น เส้นผ่านศูนย์กลางราก และความยาวของรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

Source	df	MS		
		เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางราก (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)
Block	2	0.74 ^{ns}	0.618 ^{ns}	1.896 ^{ns}
Treatment	4	0.84 ^{ns}	0.580 ^{ns}	6.977 ^{ns}
Error	8	0.85	0.497	5.514
%CV		1.76	5.90	2.91

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 5%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 1%

ตารางภาคผนวกที่ 2 ANOVA ของน้ำหนักสด ความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ และปริมาณแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารกวางเครือแดง

Source	df	MS		
		น้ำหนักสด (ก.)	ความหนาของชั้น คอร์เท็กซ์ (มม.)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)
Block	2	6955.093 ^{ns}	0.087 ^{ns}	107.666 ^{ns}
Treatment	4	2856.498 ^{ns}	1.790 ^{**}	267.234 ^{**}
Error	8	8024.426	0.058	17.372
%CV		15.47	23.08	32.02

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 5%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 1%

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลของเอทีฟอนต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นกวางเครือแดง และเส้นผ่านศูนย์กลางรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

ปัจจัยเอทีฟอน	เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางราก (ซม.)
ไม่ฉีดพ่นเอทีฟอน	8.72a ^{1/}	7.45a ^{1/}
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm	8.79a	7.00a
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200 ppm	8.81a	7.04a
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 ppm	8.94a	7.78a
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 400 ppm	9.12a	7.99a

^{1/} เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลของเอทีฟอนต่อความยาวราก และน้ำหนักสดของรากสะสมอาหารของกวางเครือแดง

ปัจจัยเอทีฟอน	ความยาวราก (ซม.)	น้ำหนักสด (ก.)
ไม่ฉีดพ่นเอทีฟอน	50.53a ^{1/}	1,147.52a ^{1/}
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm	51.15a	1,074.58a
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200 ppm	52.96a	1,246.47a
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 ppm	54.21a	1,491.69a
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 400 ppm	53.22a	1,517.17a

^{1/} เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลของเอทีฟอนต่อความหนาของชั้นคอร์เท็กซ์ และปริมาณแอนโทไซยานิน
ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง

ปัจจัยเอทีฟอน	ความหนาของ ชั้นคอร์เท็กซ์ (มม.)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (ไมโครกรัมต่อกรัม) น้ำหนักสด
ไม่ฉีดพ่นเอทีฟอน	2.52a ^{1/}	18.64a ^{1/}
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm	2.65a	21.99ab
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200 ppm	3.34b	28.86b
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 ppm	3.96c	37.63c
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 400 ppm	4.27c	40.24c

^{1/} เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดงด้วยวิธี DPPH

ความเข้มข้นของสารสกัด สารสกัดกวาวเครือแดง (µg/100 ml)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH					
	T1	T2	T3	T4	T5	trolox
0	0	0	0	0	0	0
25	15.24	16.89	20.04	20.46	21.24	18.94
50	26.51	27.88	35.35	37.32	36.96	36.22
75	36.00	42.00	50.61	55.92	57.75	58.45
100	61.35	61.32	73.44	74.85	73.99	77.71

ตารางภาคผนวกที่ 7 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดกวางเครือแดงด้วยวิธี ABTS

ความเข้มข้นของสารสกัด แอสโทไซยานิน ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS					
	T1	T2	T3	T4	T5	trolox
0	0	0	0	0	0	0
20	11.41	13.57	16.25	17.48	29.63	23.36
40	22.19	20.80	24.27	53.46	53.53	57.42
60	31.53	26.64	36.86	75.34	73.35	81.60
80	39.62	38.93	47.55	82.15	87.66	92.18
100	49.19	54.26	60.48	93.23	94.38	98.28

ตารางภาคผนวกที่ 8 ANOVA ของค่า IC_{50} จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS และ lag time ของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวางเครือแดงทั้ง 5 ทรีตเมนต์

Source	df	MS		
		ค่า IC_{50} ของ วิธี DPPH	ค่า IC_{50} ของ วิธี ABTS	lag time ของฤทธิ์ยับยั้ง LDL oxidation
Block	2	8.68 ^{ns}	1.961 ^{ns}	6.663 ^{ns}
Treatment	4	283.568**	2291.063**	500.83**
Error	8	1.553	10.163	3.241
%CV		12.22	34.68	37.05

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 5%

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 1%

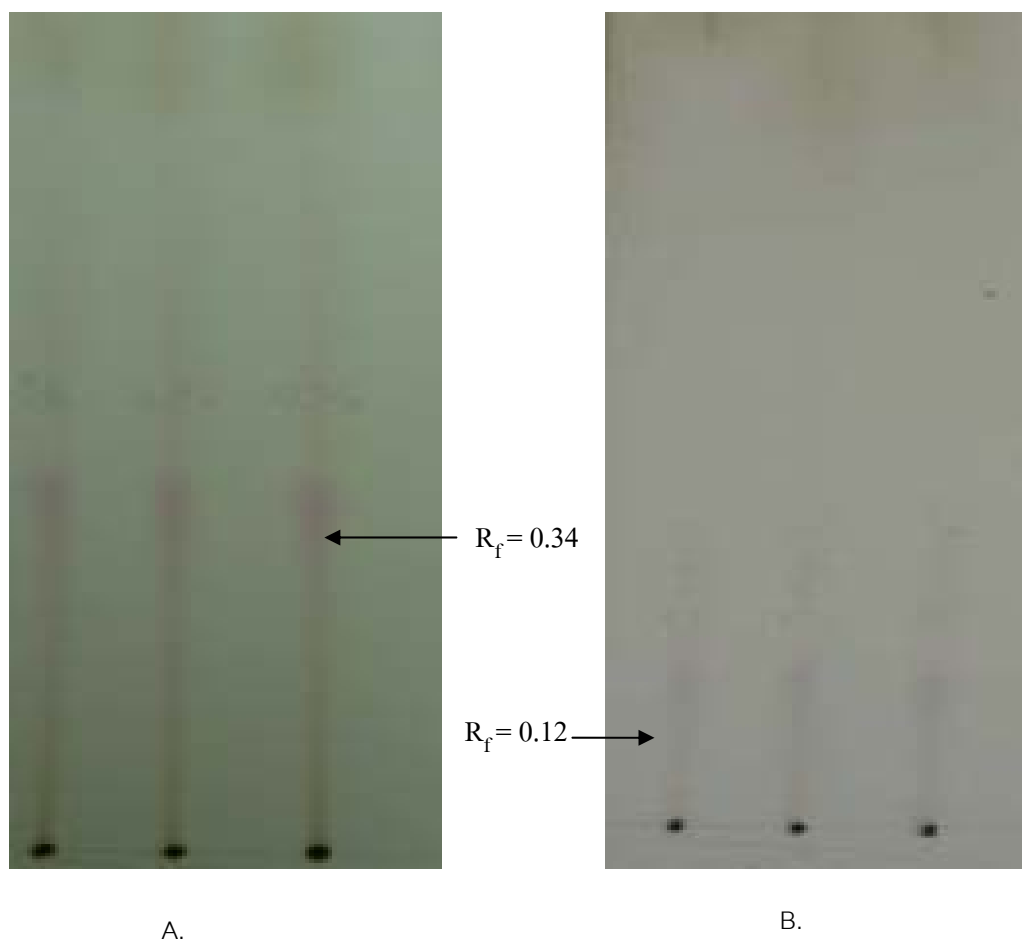
ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation ของสารสกัดกวางเครือแดง และ trolox

กลุ่มทดลอง (สารสกัดกวางเครือแดง)	ค่า IC ₅₀ ของ วิธี DPPH	ค่า IC ₅₀ ของ วิธี ABTS	lag time ของ LDL oxidation
ไม่ฉีดพ่นเอทีฟอน	85.82a ^{1/}	100.12a ^{1/}	34.99a ^{1/}
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 100 ppm	84.48a	98.16a	35.25a
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 200 ppm	69.91b	82.69b	45.03b
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 300 ppm	66.67c	46.3c	57.41c
ฉีดพ่นเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 400 ppm	66.27c	43.24c	59.03c
trolox	65.11c	41.46c	68.26c

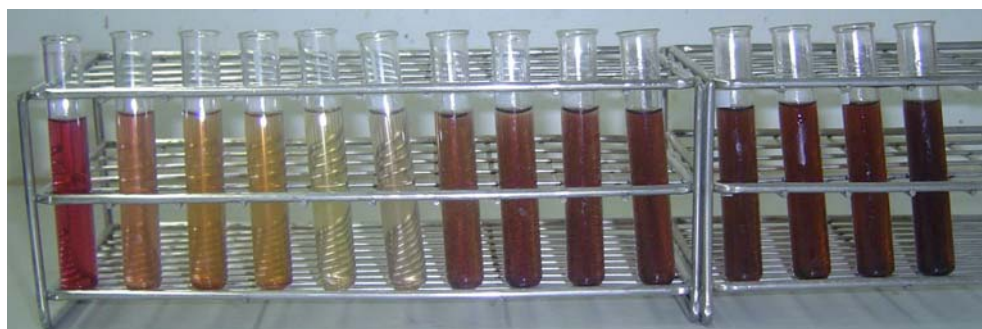
^{1/} เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา LDL oxidation ที่เติมสารสกัดกวางเครือแดง 5 ทริตเมนต์ (T1-T5) และ trolox และปฏิกิริยา LDL oxidation ที่ไม่เติมสารสกัดกวางเครือแดง (control)

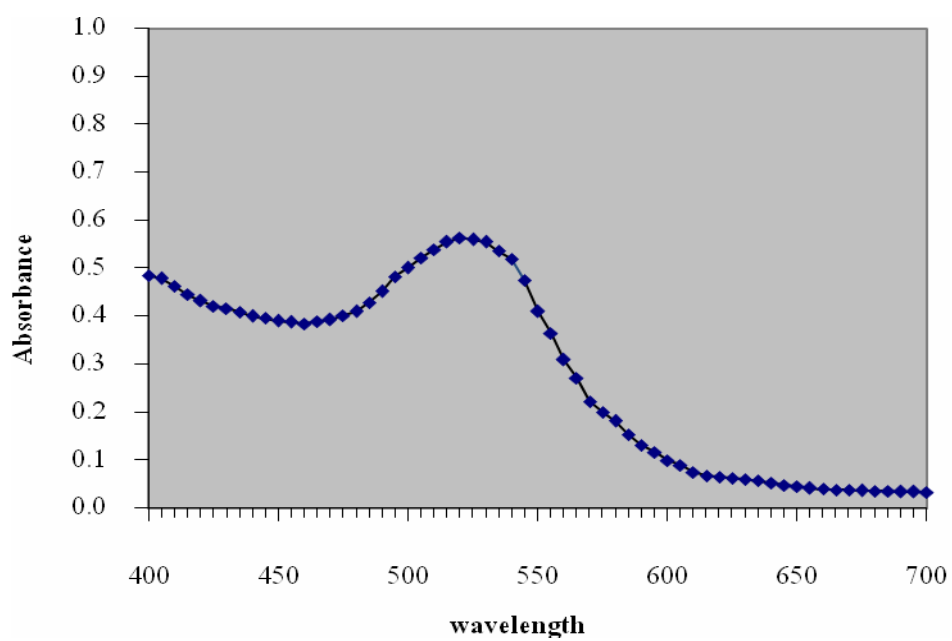
เวลา (นาที)	control	T1	T2	T3	T4	T5	trolox
0	0.0229	0.0206	0.0225	0.0211	0.0092	0.0083	0.0075
10	0.0268	0.0239	0.0299	0.0245	0.0108	0.0107	0.0099
20	0.0423	0.0279	0.0342	0.0288	0.0125	0.0123	0.0124
30	0.1187	0.0341	0.0412	0.0333	0.0167	0.0154	0.0154
40	0.1998	0.0504	0.0591	0.0401	0.0198	0.0184	0.0205
50	0.2239	0.1109	0.1254	0.0560	0.0247	0.0268	0.0234
60	0.2224	0.1913	0.1986	0.1402	0.0394	0.0381	0.0291
70	0.1978	0.2156	0.2194	0.1867	0.0709	0.0680	0.0352
80	0.1500	0.2218	0.2246	0.2101	0.1752	0.1639	0.0627
90	0.1075	0.2012	0.1977	0.1989	0.2085	0.2008	0.1978
100	0.0629	0.1530	0.1521	0.1611	0.2104	0.2096	0.2278



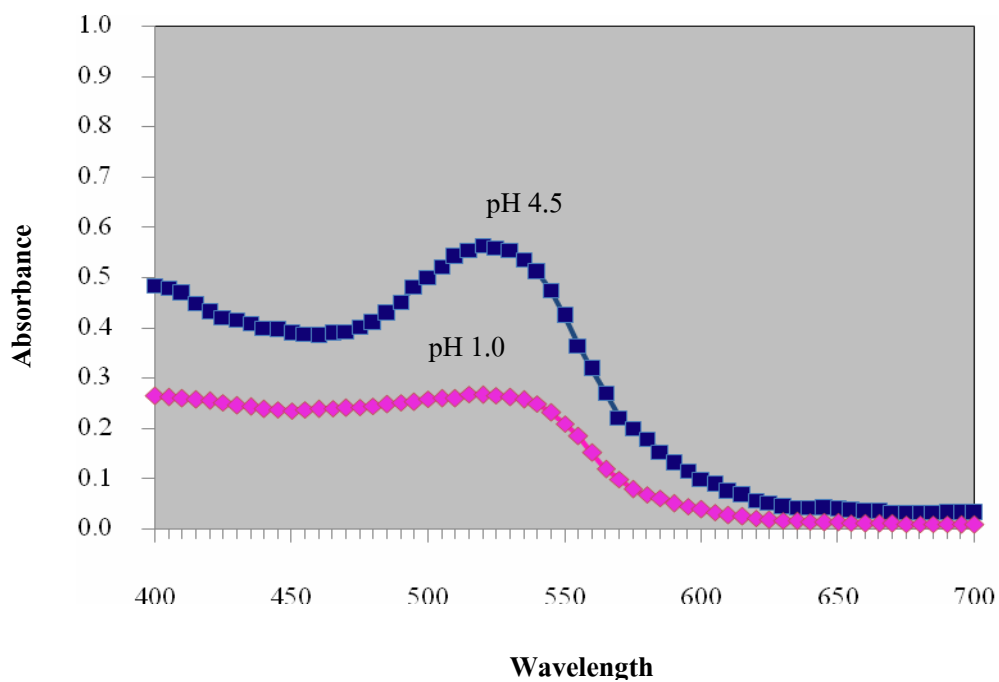
ภาพผนวกที่ 1 ค่า R_f (0.34) ของสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบบนแผ่นโครมาโตกราฟี (กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอร์มิก และน้ำ ในอัตราส่วน 7: 51: 42) (A.) และค่า R_f (0.12) ของสารสกัดแอนโทไซยานินบนแผ่นโครมาโตกราฟี (กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอร์มิก และน้ำในอัตราส่วน 25: 24: 51) (B.)



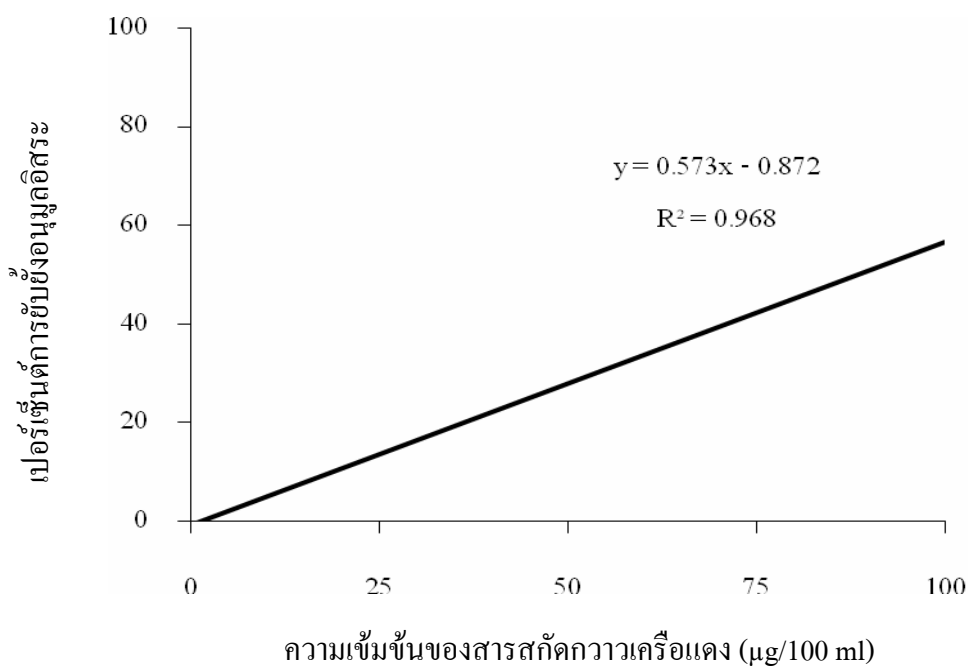
ภาพผนวกที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบที่ pH 1-14



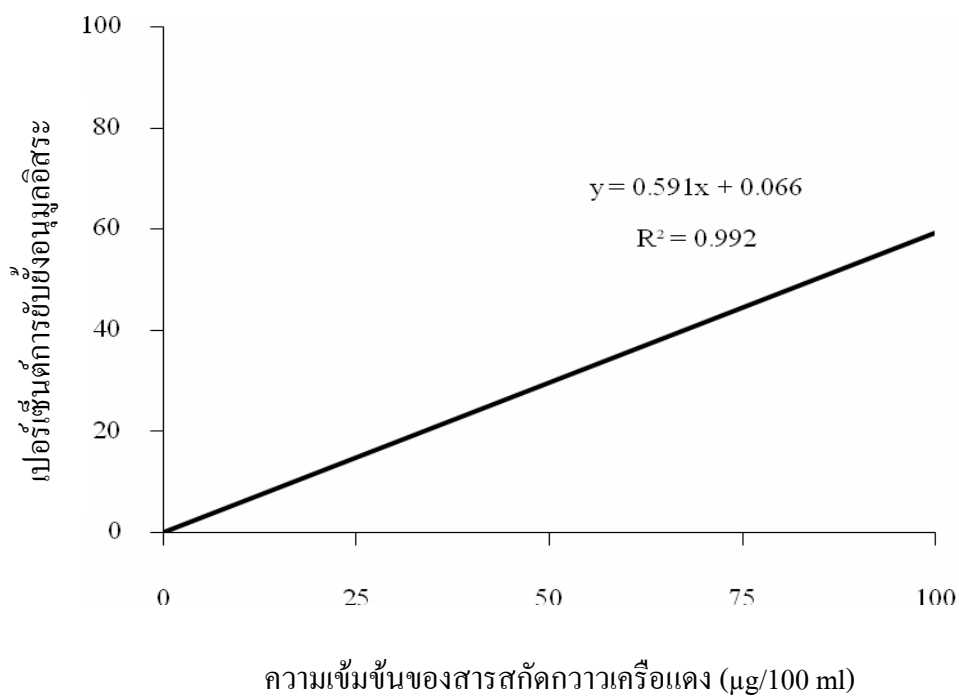
ภาพผนวกที่ 3 สเปกตรัมของสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบที่ 510 nm



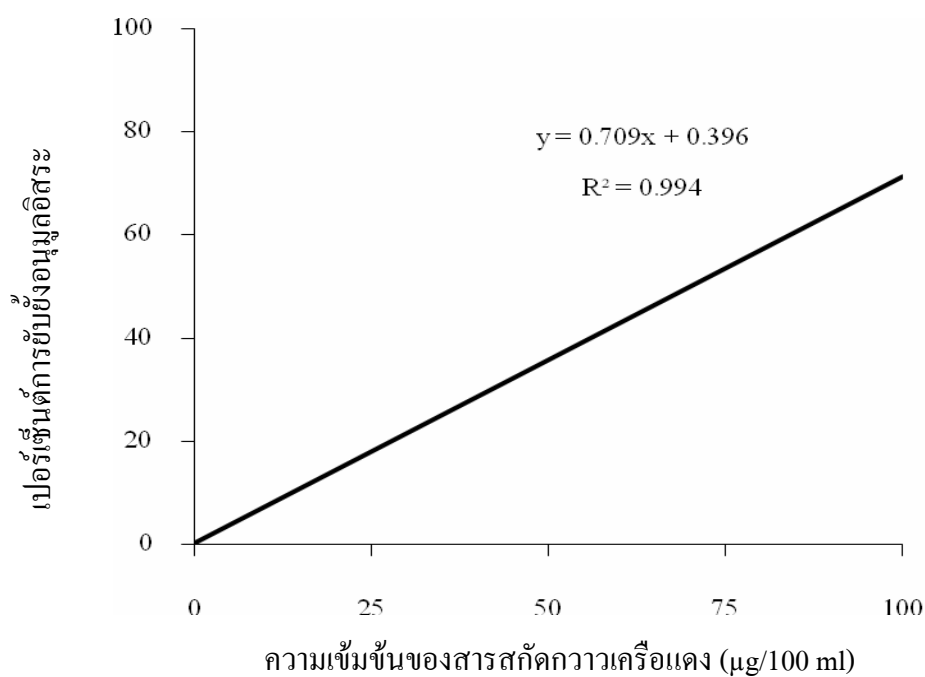
ภาพผนวกที่ 4 สเปกตรัมของสารสกัดควาวเครือแดงที่มีแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบที่ pH 1 และ 4.5



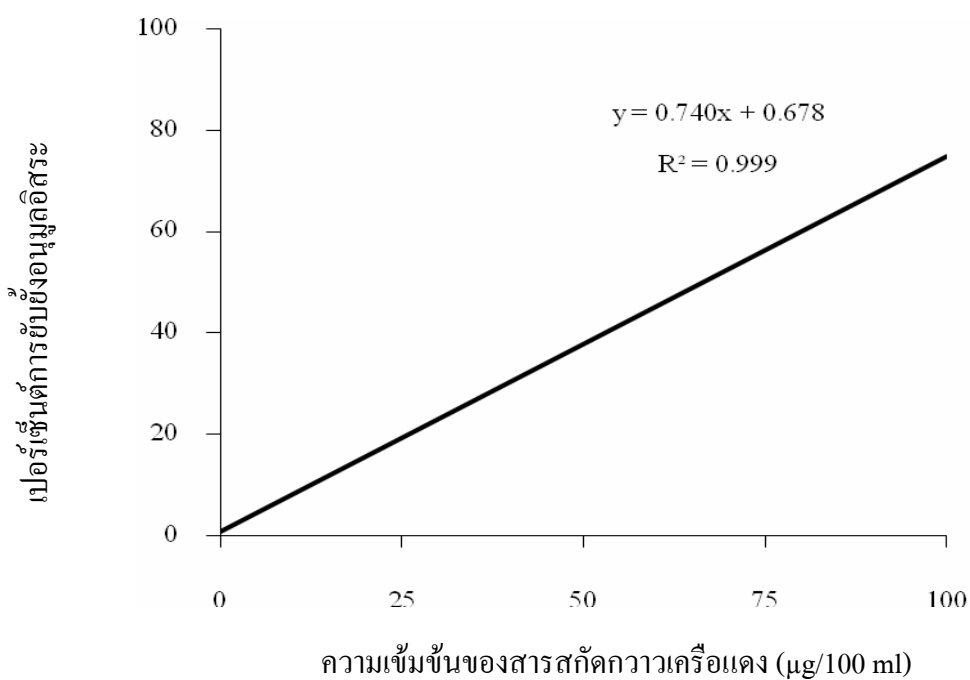
ภาพผนวกที่ 5 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 0 ppm



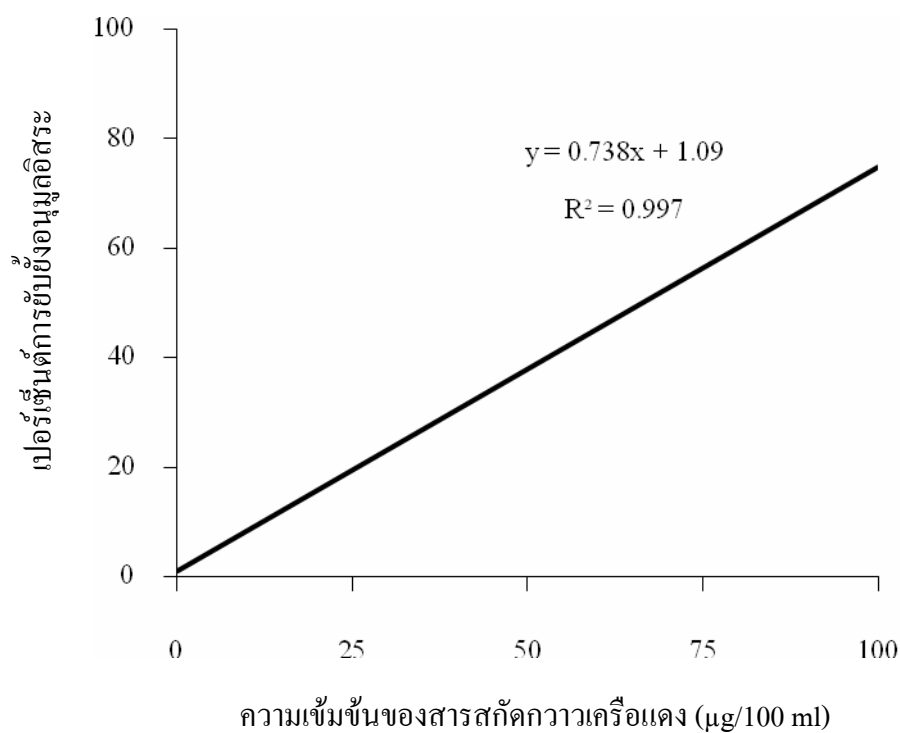
ภาพผนวกที่ 6 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 100 ppm



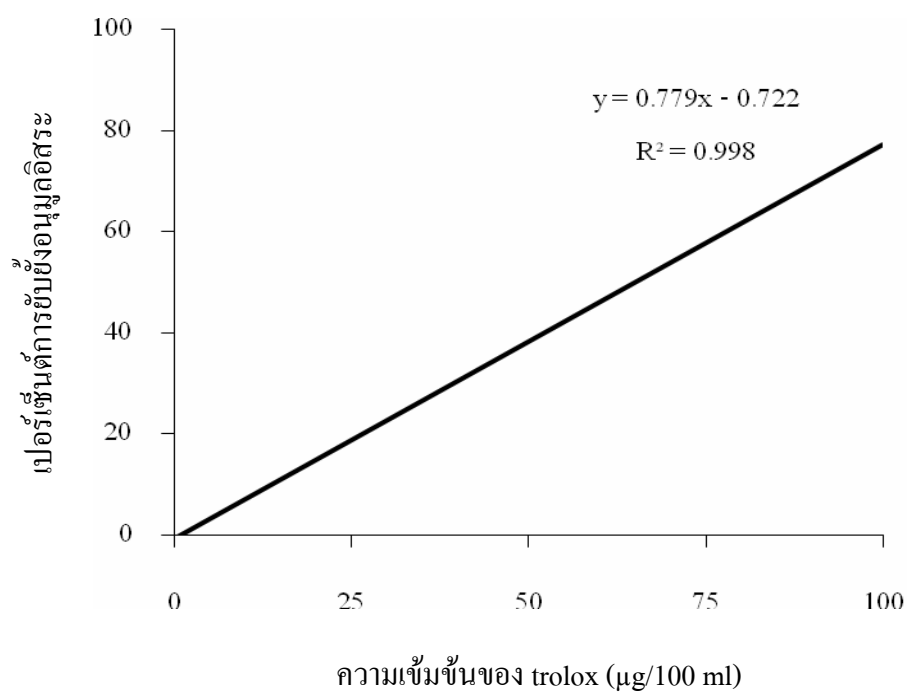
ภาพผนวกที่ 7 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วย เอทีฟอนความเข้มข้น 200 ppm



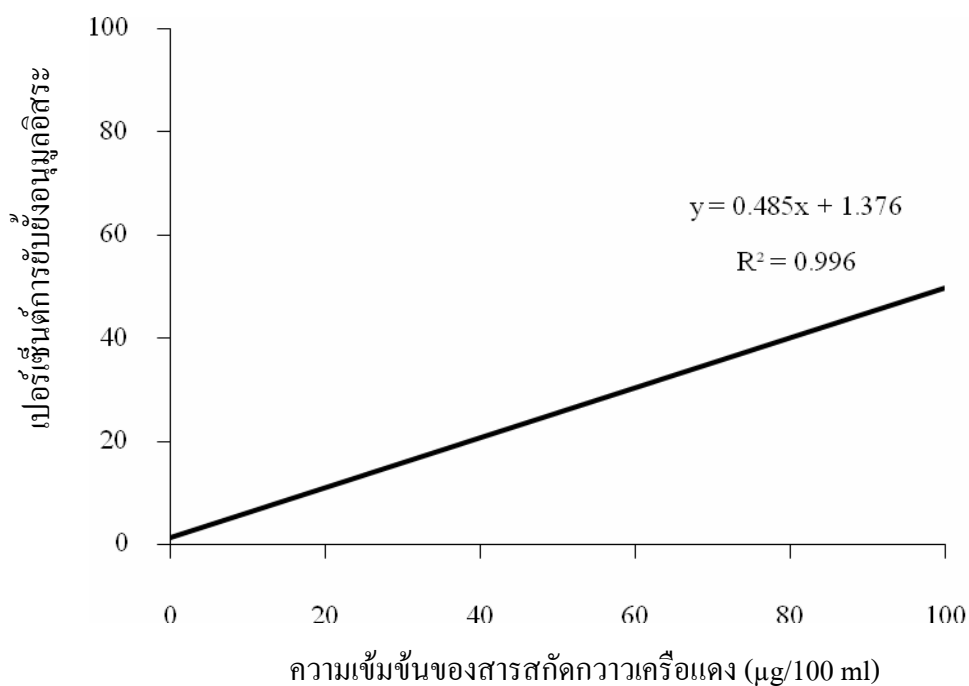
ภาพผนวกที่ 8 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วย เอทีฟอนความเข้มข้น 300 ppm



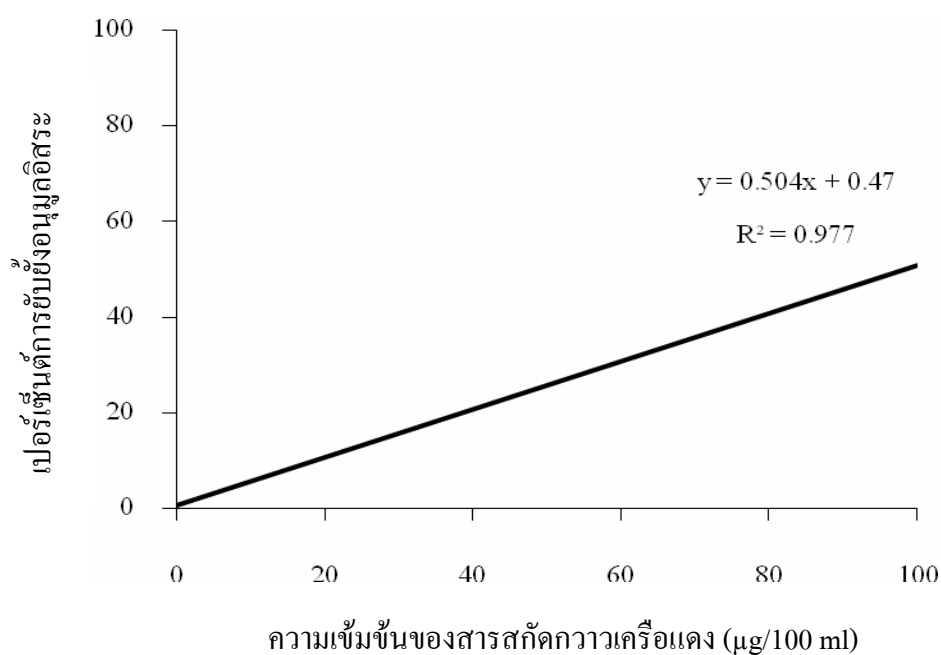
ภาพผนวกที่ 9 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดควาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 400 ppm



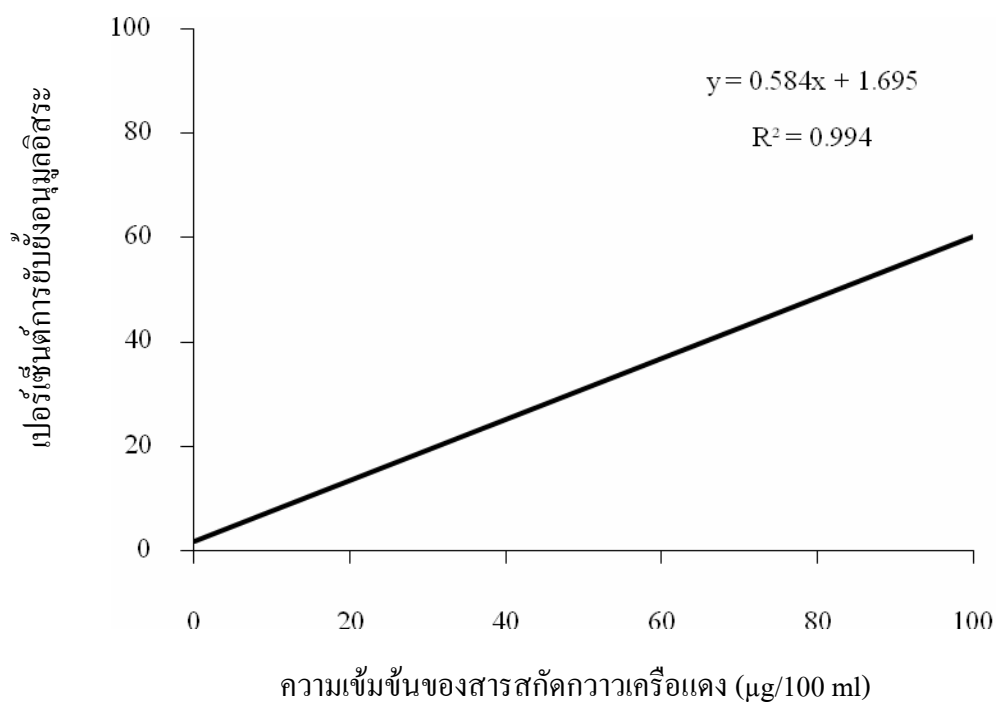
ภาพผนวกที่ 10 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของ trolox



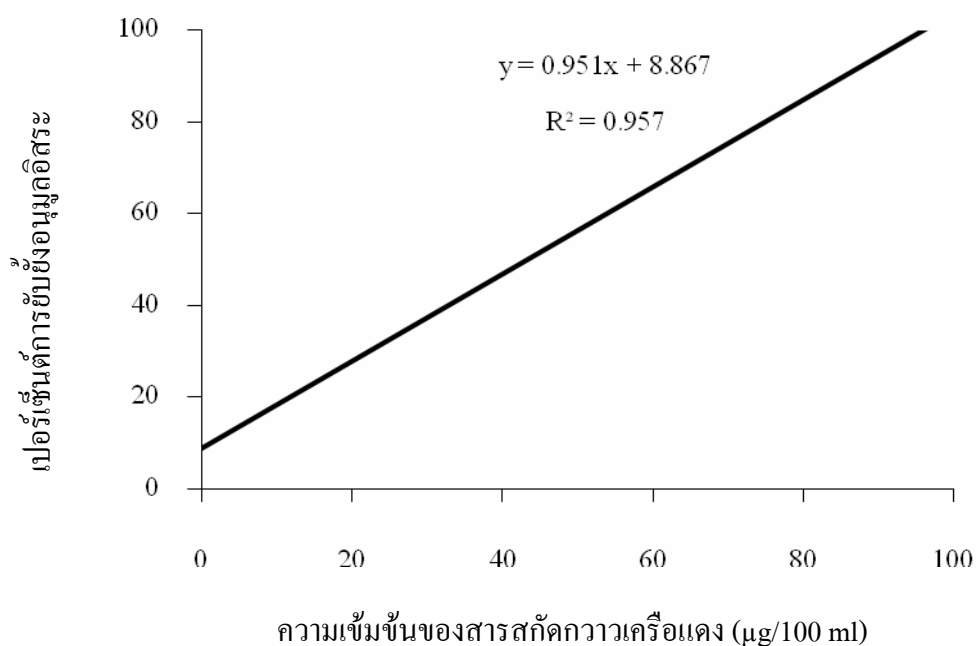
ภาพผนวกที่ 11 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 0 ppm



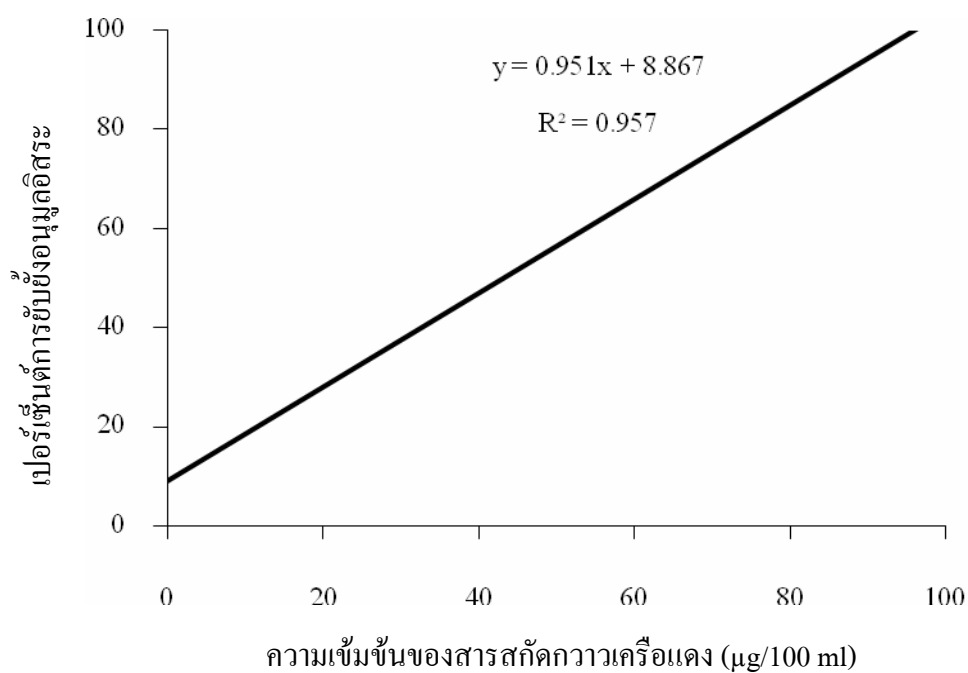
ภาพผนวกที่ 12 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกาวเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 100 ppm



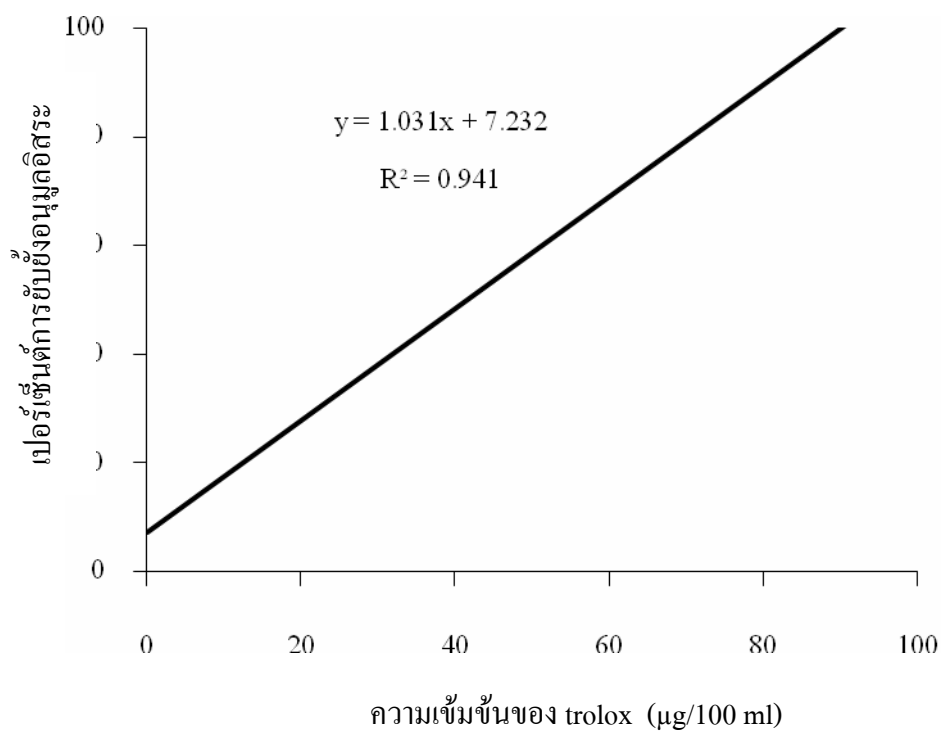
ภาพผนวกที่ 13 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 200 ppm



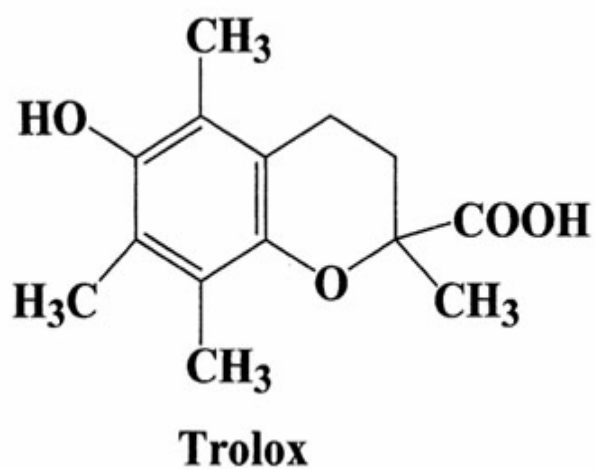
ภาพผนวกที่ 14 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 300 ppm



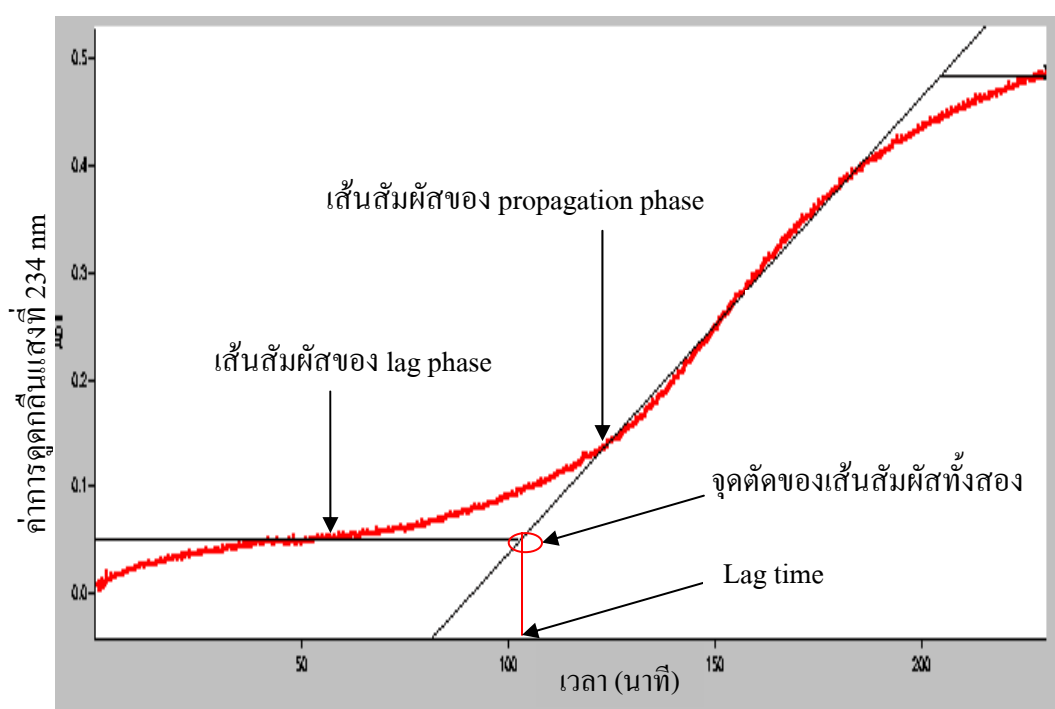
ภาพผนวกที่ 15 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดกวางเครือแดงที่ฉีดพ่นด้วยเอทีฟอนความเข้มข้น 400 ppm



ภาพผนวกที่ 16 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของ trolox



ภาพผนวกที่ 17 สูตร โครงสร้างของ trolox



ภาพผนวกที่ 18 วิธีหา lag time จากจุดตัดของเส้นสัมผัสของ lag phase และเส้นสัมผัสของ propagation phase (ดัดแปลงจาก Greenrod, H.W. *et al.*, 2007)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจุฬาลักษณ์ ทวีบุตร เกิดเมื่อวันที่ 3 กันยายน 2525 ที่อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2548 ภายหลังสำเร็จการศึกษาได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีการศึกษา 2548