ความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของน้ำทับทิม (*Punica granatum* Linn.) คั้น 2 สายพันธุ์

สารนิพนธ์
ของ
ฉลองรัตน์ หมื่นขวา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
มีนาคม 2555

ความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของน้ำทับทิม (*Punica granatum* Linn.) คั้น 2 สายพันธุ์

สารนิพนธ์

ของ

ฉลองรัตน์ หมื่นขวา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของน้ำทับทิม(*Punica granatum* Linn.) คั้น 2 สายพันธุ์

บทคัดย่อ

ของ

ฉลองรัตน์ หมื่นขวา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2555

ฉลองรัตน์ หมื่นขวา (2555). *ความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของน้ำทับทิม* (*Punica granatum* Linn.) *คั้น 2 สายพันธุ์*. สารนิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รัตนา สัมพันธชิต.

การวิจัยนี้ ศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้น (*Puniga granatum Linn*.) 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์จีน ในด้านการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ AAPH (2,2'-amidinopropane hydrochloride) โดยผสมดีเอ็นเอพลาสมิด pBluescript (II) SK- กับน้ำทับทิมคั้น หรือ Trolox แล้วหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้พลาสมิดสภาพธรรมชาติ supercoiled ถูกทำลายไปเป็น open circular และ linear ร้อยละ 50 พบว่าน้ำทับทิมคั้นทั้ง 2 สายพันธุ์ และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox แสดงผลการยับยั้งในลักษณะแปรตามความเข้มข้นของสารที่ใช้ (dose dependent) น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอดีกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนประมาณ 2.0 เท่า ($p<0.01$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 41.16 ± 0.45 และ 83.34 ± 0.69 nL ตามลำดับ และพบความสามารถในการการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-dephenyl-1-picrylhydrazyl radical) ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยสูงกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนเช่นกัน โดยสูงกว่าประมาณ 2.5 เท่า ($p<0.01$) คือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.89 ± 0.02 และ 2.26 ± 0.03 µL ตามลำดับ ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับปริมาณโพลีฟีนอลรวมและปริมาณวิตามินซี (วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC) โดยน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีปริมาณโพลีฟีนอลรวมสูงกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนประมาณ 2.7 เท่า คือ 2.65 ± 0.02 และ 0.97 ± 0.01 µgGAE/µL และพบวิตามินซีเฉพาะในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย คือมีปริมาณ 0.122 ± 0.00 µg/µL ดังนั้น น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน

ANTIOXIDANT PROTECTING ACTIVITY OF 2 CULTIVARS OF POMEGRANATE (*Puniga granatum* Linn.) JUICE AGAINST FREE RADICAL INDUCED OXIDATIVE DNA DAMAGE

AN ABSTRACT

BY

CHALONGRAT MUENKHWA

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Master of Education Degree in Chemistry

at Srinakarinwirot University

March 2012

Chalongrat Muenkhwa. (2012). *Antioxidant protecting activity of 2 cultivars pomegranate (Punica granatum* Linn.) *juice against free radical induced oxidative DNA damage*. Master's Project, M.Ed. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Project Advisor: Assist. Ratana Sampantachit

The aim of this research was to study the antioxidant protecting activity of 2 pomegranate cultivars (*Punica granatum* Linn.) juice (Thai and Chinese cultivar) against free radical induced oxidative DNA damage initiated by AAPH (2,2'-amidinopropane hydrochloride). Two cultivars of pomegranate juice or Trolox, a standard antioxidant, were mixed with plasmid pBluescript (II) SK- followed by incubating with AAPH and assessed for their ability in the inhibition of oxidative DNA damage by measuring the conversion of supercoiled pBluescript to the open circular and linear form. IC_{50}, the concentration causing half- maximal denatured forms of plasmids ,open circular plus linear form, were determined. Two cultivars of pomegranate juice showed dose dependent inhibition of the damage. The results revealed that Thai cultivar pomegranate juice exhibited 2.0-fold more efficient in protecting the oxidative DNA damage than Chinese cultivar with the IC_{50} of 41.16 ± 0.45 and 83.34 ± 0.69 nL respectively ($p<0.01$) and also showed significant ability ($p<0.01$) 2.5-fold over Chinese cultivar to scavenge DPPH radical (2,2-dephenyl-1-picrylhydrazyl radical) with the IC_{50} of 0.89 ± 0.02 and 2.26 ± 0.03 µL respectively. These results corresponded with the contents of two antioxidant, polyphenols and vitamin C (analyzed by HPLC), presented in the juices. Thai cultivar pomegranate juice possessed higher amount of total polyphenolic compounds (2.65 ± 0.02 µgGAE/µL) 2.7-fold over Chinese cultivvar (0.97 ± 0.01 µgGAE/µL) and vitamin C content was only detected in Thai cultivar (0.122 ± 0.00 µg/µL). Therefore, Thai cultivar pomegranate juice has higher potential in antioxidant activity over Chinese cultivar.

อาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์ ประธานคณะกรรมการบริหารหลักสูตร และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาสารนิพนธ์เรื่อง ความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของน้ำทับทิม (*Punica granatum* Linn.) คั้น 2 สายพันธุ์ ของ ฉลองรัตน์ หมื่นขวา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

อาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รัตนา สัมพันธชิต)

ประธานคณะกรรมการบริหารหลักสูตร

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รัตนา สัมพันธชิต)

..... กรรมการสอบสารนิพนธ์

(อาจารย์ ดร.วีณา เสียงเพราะ)

..... กรรมการสอบสารนิพนธ์

(อาจารย์ ดร.สุเชาวน์ ดอนพุดซา)

อนุมัติให้รับสารนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร มากตุ่น)

วันที่.....เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555

ประกาศคุณูปการ

สารนิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากความกรุณาช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รัตนา สัมพันธชิต อาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์ ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์อย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และขอบพระคุณ คุณชุติมา ศรีสุข นิสิตปริญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้อนุเคราะห์พลาสมิดต้นแบบสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอบกราบขอบพระคุณ คุณจิราพรรณ ทองหยอด หัวหน้ากลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบฯลฯ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจในการทำปฏิบัติการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณ นันวดี ทองกระจ่าง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คุณ วิรัช วงศ์ภักดี เจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำปฏิบัติการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำหลักสูตร เพื่อนๆ พี่ๆ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในการจัดทำสารนิพนธ์ครั้งนี้

คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากสารนิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณแด่บิดา มารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาและอบรมสั่งสอน

ฉลองรัตน์ หมื่นขวา

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ความสำคัญของการวิจัย	4
	ขอบเขตของการวิจัย	4
	นิยามศัพท์เฉพาะ	5
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	6
	เอกสาร	6
	อนุมูลอิสระ	6
	ผลเสียหายของการมีอนุมูลอิสระเกินสมดุลในร่างกาย	9
	ระบบที่ควบคุมปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระให้สมดุล	11
	สารต้านอนุมูลอิสระ	12
	ทับทิม	19
	การวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำทับทิมคั้น	23
	การศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอเนื่องจากการถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ	24
	งานวิจัย	27
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	32
	อุปกรณ์และสารเคมี	32
	วิธีทดลอง	34
	การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้น (DPPH Assay)	34
	การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้น	36
	การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้นโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	37
	การศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้นต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ AAPH	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 **ผลการวิจัย**	44
ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้น	44
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้น	46
ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้น โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง	47
ผลการศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้น ต่อการป้องกันความเสียหายของ ดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ	49
5 **สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	56
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	56
ข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก. สถิติที่ใช้ในการวิจัย	71
ภาคผนวก ข. ภาพประกอบและตารางวิเคราะห์ข้อมูลวิจัย	73
ประวัติย่อผู้วิจัย	92

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง..... 7

2 กลุ่มของสารประกอบพฤกษเคมีที่พบในน้ำทับทิม..... 21

3 ระบบของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้น 38

4 การศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อความเสียหาย plasmids DNA..... 40

5 การศึกษาผลของ Trolox ต่อการป้องกันความเสียหาย plasmids DNA จาก AAPH... 41

6 การศึกษาผลของน้ำทับทิมคั้นไทยต่อการป้องกันความเสียหาย plasmids DNA จาก AAPH 42

7 การศึกษาผลของน้ำทับทิมคั้นจีนต่อการป้องกันความเสียหาย plasmids DNA จาก AAPH 43

8 ค่า IC_{50} ปริมาณโพลีฟีนอลรวม และปริมาณวิตามินซีของน้ำทับทิมคั้นไทย น้ำทับทิมคั้นจีนและสารมาตรฐาน Trolox 47

9 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50}) ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวม ปริมาณวิตามินซี และความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอ (IC_{50}) ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสารมาตรฐาน Trolox..... 60

10 ข้อมูลปริมาณโครงรูปต่างๆ ของพลาสมิดคิดเป็น raw volume ที่ได้จาก software Genetool 87

11 การคำนวณเป็นร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลาย (open circular + linear) และไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (supercoiled) 91

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 แหล่งกำเนิดของอนุมูลอิสระนำไปสู่ความเสียหายของดีเอ็นเอ..... 8

2 ความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสะ..... 10

3 กลไกการป้องกันอนุมูลอิสระโดยเอนไซม์..... 12

4 โครงสร้างฟลาแวน..... 14

5 โครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์..... 15

6 ปฏิกิริยา oxidation-reduction ของวิตามินซี 16

7 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มวิตามินอี..... 17

8 โครงสร้างทางเคมีของ Trolox 18

9 โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid 18

10 ผลทับทิม..... 19

11 โครงสร้างอนุมูล DPPH..... 23

12 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพลาสมิดเมื่อถูกออกซิไดส์จากสภาพธรรมชาติ 25

13 การเคลื่อนที่ของพลาสมิดใน agarose gel electrophoresis..... 25

14 พลาสมิด pBluescript 26

15 โครงสร้างของ AAPH.. 26

16 การหาค่า IC_{50} ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ..... 45

17 กราฟแท่งเปรียบเทียบ IC_{50} และปริมาณโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์จีน (μgGAE/μL) 46

18 เปรียบเทียบโครมาโทรแกรมการแยกของวิตามินซี (L-Ascorbic acid) โดย วิธี Reversed phase ด้วย คอลัมน์ Symmetry® C18 5μM ของสารมาตรฐาน และน้ำทับทิมคั้น 48

19 รูปแบบ agarose gel electrophoresis ของพลาสมิด pBluescript (25ng/μL) ปริมาตร 10 μL ทำปฏิกิริยากับ AAPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ 49

20 ปริมาณร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript ที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (open circular + linear) แปรตามสภาพของ AAPH ที่เพิ่มขึ้น.... 50

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

21 ผลของ Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10μL ต่อการป้องกันความเสียหายพลาสมิด pBluescript (25ng/μL) ปริมาตร 5 μL ที่ถูกชักนำด้วย 20 mM AAPH 51

22 ผลของ Trolox ที่ความเข้มข้น 0 0.63 1.25 2.5 และ 5 mM ต่อร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดความเสียหายสภาพธรรมชาติด้วย 20 mM AAPH 52

23 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่อัตราส่วนการเจือจางต่างๆปริมาตร 10μL ต่อการป้องกันความเสียหายพลาสมิด pBluescript (25ng/μL) ปริมาตร 5 μL ที่ถูกชักนำด้วย 20 mM AAPH 53

24 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่อัตราส่วนการเจือจางต่อร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดความเสียหายสภาพธรรมชาติด้วย 20 mM AAPH... 53

25 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน ที่อัตราส่วนการเจือจางต่างๆ ปริมาตร 10 μL ต่อการป้องกันความเสียหายพลาสมิด pBluescript (25ng/μL) ปริมาตร 5 μL ที่ถูกชักนำด้วย 20 mM AAPH..... 54

26 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนที่อัตราส่วนการเจือจางต่อร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดความเสียหายสภาพธรรมชาติด้วย 20 mM AAPH. 55

27 กราฟแสดงการลดลงของ DPPH radical โดยสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป..... 74

28 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป 74

29 การหาค่า IC_{50} ของการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย และน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน..... 75

30 กราฟมาตรฐาน Gallic acid 78

31 กราฟมาตรฐานวิตามินซี..... 78

32 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินซีและพารามิเตอร์ต่างที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC 79

33 โครมาโทแกรมน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและพารามิเตอร์ต่างที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC 80

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

34 โครมาโทแกรมน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนและพารามิเตอร์ต่างที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC..... 81

35 โครมาโทแกรมน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่ spike สารมาตรฐานวิตามินซีและไม่ spike สารมาตรฐานที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC..... 82

36 gel electrophoresis ของพลาสมิด pBluescript ในกรณีต่างๆ..... 83

37 การหาค่า IC_{50} ต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระของ Trolox น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน..... 86

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับทั่วไปในวงการแพทย์ว่าการเกิดโรคหลายชนิด มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระในร่างกาย การทำลายหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระดังกล่าว จะช่วยในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นได้ (โอภา วัชรคุปต์; และคนอื่นๆ. 2549: 123) ดังนั้นร่างกายต้องการสารที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งเรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีการวิจัยจำนวนมากรายงานถึงความสัมพันธ์ของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการลดอัตราเสี่ยงและเพิ่มอัตราการป้องกันโรคต่างๆที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Borochov-Neor; et al. 2009: 189-195) สารต้านอนุมูลอิสระพบได้มากในพืชสมุนไพร ผัก และผลไม้ การบริโภคผักและผลไม้เป็นประจำจะช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจ (heart disease) โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) และโรคหลอดเลือดในสมอง (stroke)(Lako; et al. 2007: 1712) ผู้บริโภคจึงให้ความสนใจในการบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติทั้งในรูปของอาหาร และเครื่องดื่ม ดังจะเห็นได้จากในปีที่ผ่านมา เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้รับความนิยมอย่างมาก โดยเฉพาะเครื่องดื่มประเภทน้ำชา น้ำผลไม้ และน้ำผัก (Gonzalez-Molina; Cristina; & Garcia- Viguera. 2009: 1364-1372)

สารต้านอนุมูลอิสระสะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของผักและผลไม้ เช่น เปลือก เนื้อหุ้มเมล็ด เมล็ด ผล ยอดอ่อนของผักและผลไม้ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบมีหลายประเภท เช่น คลอโรฟีล (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และสารประกอบประเภทโพลีฟีนอล (polyphenol) (Lansky; & Newman. 2007: 177-206) ซึ่งประกอบด้วยสารหลายกลุ่ม กลุ่มที่สำคัญคือ กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม คือ ฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาโวน (flavone) ฟลาวาโนน (flavanone) ฟลาวานอล (flavanol) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) และแอนโทไซยานิดีน (anthocyanidine) (Lako ; et al. 2007: 1712) ดังนั้น การบริโภคผักและผลไม้เป็นประจำจะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยยับยั้งและป้องกันโรคต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้

ร่างกายประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก มีการใช้ออกซิเจนเพื่อเผาผลาญสารอาหารโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อให้ได้พลังงาน กระบวนการเผาผลาญและกระบวนการทำงานของเซลล์ดังกล่าวทำให้เกิดอนุมุลอิสระขึ้นในร่างกาย (พนิดา กุลประสูติดิลก. 2548: 45-50) โดยอนุมูลอิสระมีหลายชนิดที่สำคัญและมีบทบาทกับกระบวนการเกิดโรคมาก คือ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\bullet -}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เป็นอันตรายและพบมากที่สุดในเซลล์ อนุมูลไฮดรอกซิล ($HO^{\bullet}$)

อนุมูลโฮโดรเปอร์ออกซิล ($HO_2^{\bullet}$) อนุมูลเปอร์ออกซิล ($RO_2^{\bullet}$) อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($NO^{\bullet}$) อนุมูลไนตริกไดออกไซด์ ($NO_2^{\bullet}$) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ร่างกายใช้ประโยชน์ของอนุมูลอิสระจำนวนหนึ่งในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย หรือใช้ในกระบวนการแปลงสัญญาณของเซลล์ (signal transduction) หากอนุมูลอิสระมีมากเกินไป ร่างกายมีระบบที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ แต่เมื่ออายุมากขึ้น และมีสิ่งเร้ามากระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้น ทำให้ร่างกายไม่สามารถต้านหรือควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้ จึงมีอนุมูลอิสระมากเกินไป ร่างกายจะเข้าสู่สภาวะเครียดซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ เรียกสภาวะนี้ว่า Oxidative stress เป็นสภาวะที่อนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลต่างๆ ของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน หรือ ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม (Kasprzak. 2002: 958-967) โดยอาจเกิดการขาดของสายดีเอ็นเอ (DNA strand break) (Kumar; & Chattopadhyay. 2007: 1377–1384) ซึ่งอาจนำไปสู่การเป็นมะเร็งได้ ดั้งนั้นเมื่อร่างกายไม่สามารถรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระได้ จึงจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเพื่อรักษาสมดุลดังกล่าว ปัจจุบันมีความพยายามค้นหาสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชพรรณธรรมชาติ เช่น ทับทิม ใบชา องุ่น ลูกหว้า ผักปลัง เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกบริโภคพืชพรรณธรรมชาติชนิดต่างๆ ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อร่างกาย

ทับทิม (*Punica granatum* Linn.) เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน (Tezcan. 2009: 873-877) มีการบริโภคทับทิมทั้งในรูปผลสดและรูปเครื่องดื่มน้ำทับทิมคั้นสำเร็จรูป ทับทิมเป็นผลไม้ที่มีสารพฤกษเคมี (phytochemical) จำนวนมากที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านโรคมะเร็ง (Lansky; & Newman. 2007: 177-206) จากรายงานของมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย ณ ลอสแองเจลิส สหรัฐอเมริกา จัดให้น้ำทับทิมเป็นน้ำผลไม้ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากที่สุด น้ำทับทิมมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากถึงเกือบ 3 เท่าของชาเขียวและไวน์แดงในปริมาณที่เท่ากัน นอกจากนี้น้ำทับทิมยังเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินซี วิตามินบี 5 และ โพแทสเซียม (นัฐพล ตั้งสุภูมิ. 2552: ออนไลน์) จากการวิจัย พบว่าการดื่มน้ำทับทิมเป็นประจำจะช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด สามารถช่วยลดความดันโลหิต (Rout; & Banerjee. 2007: 3159-3163) ต่อต้านการติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส (Naz; et al. 2007: 341-345)

ทับทิม เป็นพืชที่คนไทยรู้จักมาช้านาน มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม เมล็ดภายในมีสีแดงสดเหมือนทับทิมอัญมณีที่ทรงคุณค่า จึงถูกเรียกว่า “ทับทิม” มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Punica granatum* Linn. มีชื่อในภาษาอังกฤษว่า Pomegranate ทับทิมมีถิ่นกำเนิดจากประเทศอิหร่าน แล้วแพร่ขยายไปสู่ดินแดนเทือกเขาหิมาลัย และตอนเหนือของอินเดีย นอกจากนี้ยังมีการเพาะปลูกถึงทางตอนใต้ของเอเชีย และขยายไปสู่แคลิฟอร์เนียโดยผู้อพยพชาวสเปน ในปี ค.ศ. 1769 (พัชรินทร์ หัตถมาตร. 2552: ออนไลน์) ในประวัติศาสตร์พบว่าได้มีการนำทับทิมมาทำเป็นยารักษาโรคตั้งแต่ 8,000 ปีมาแล้ว ปลูก

มากในประเทศจีน ในประเทศเปอร์เซียโบราณมีความเชื่อว่าคุณค่าทางอาหารทุกชนิดที่มีอยู่ในผลไม้ต่างๆ นั้นรวมกันอยู่ในทับทิม (Lansky; & Newman. 2007: 177-206) นอกจากนี้ยังพบว่าในตำรายาสมุนไพรของไทยใช้ส่วนต่างๆ ของทับทิมมารักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น ใบ แก้ท้องร่วง แก้อาเจียน ทำยาล้างตา ชะล้างแผล มีหนองเรื้อรังบนศีรษะ ดอก ใช้ห้ามเลือด แก้เลือดกำเดา แก้บาดแผล เมล็ด บำรุงกระเพาะอาหาร แก้ปวดกระเพาะอาหาร แก้ท้องเสีย เป็นต้น (สมุนไพรไทยทางทันตกรรม. 2550: 124-125) ประกอบกับในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมาก รายงานว่าทับทิมมีบทบาทสูงในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น โรคเกี่ยวกับระบบหลอดเลือด และโรคมะเร็ง (Syed; Afaq; & Mukhtar. 2007: 377-385) ขจัดไขมันส่วนเกินป้องกันโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ฟื้นฟูสู่สภาพเดิมของหัวใจ และตับ เป็นต้น (Tezcan; et al. 2009: 873-877) ดังนั้น ทับทิมจึงเป็นผลไม้ที่น่าศึกษาทางพฤกษเภสัชวิทยาทั้งในด้าน ปริมาณ ชนิด และสรรพคุณของสารพฤกษเคมีที่พบ จากรายงานการวิจัยของมหาวิทยาลัยฟิลาเดลเฟียในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าน้ำทับทิมคั้น มีสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอลจำนวนมาก และพบฟลาโวนอยด์กลุ่มแอนไทไซยานินมาก (Anthocyanin) (Jaiswal ; & Porter. 2010: 11-16) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดงในทับทิม สามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดความเสียหายของชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ ลิพิด โปรตีนและดีเอ็นเอ

ทับทิมที่วางจำหน่ายในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ (cultivar) เช่น สายพันธุ์จากจีน อินเดีย เวียดนาม และไทย ซึ่งสายพันธุ์ไทย มักปลูกไว้เป็นไม้ประดับ เสริมศิริมงคลและโชคลาภ (สมุนไพรไทยทางทันตกรรม. 2550: 124-126) ซึ่งมีผลเล็กรสชาติเปรี้ยว เมล็ดโตและน้ำน้อย ไม่ชวนบริโภค สายพันธุ์ที่นิยมนำมาบริโภคและมีวางจำหน่ายมาก คือสายพันธุ์จีน แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันสายพันธุ์ไทยได้ถูกนำมาพัฒนาสายพันธุ์ให้ลูกใหญ่ขึ้นสามารถรับประทานได้ และมีประโยชน์ต่อสุขภาพสูง

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในด้านการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอในน้ำทับทิมคั้นสดทั้ง 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์จีน และสายพันธุ์ไทย เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกบริโภคน้ำทับทิมที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสูงสุด และทราบสรรพคุณของทับทิมทั้ง 2 สายพันธุ์

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน
2. ศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมจากน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน
3. วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4. ศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนและสายพันธุ์ไทยต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

5. เป็นข้อมูลพื้นฐานของผู้บริโภคในการเลือกบริโภคน้ำทับทิมคั้นและทราบสรรพคุณของน้ำทับทิมทั้ง 2 สายพันธุ์

ความสำคัญของงานวิจัย

1. เพื่อทราบสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

2. เพื่อทราบปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมจากน้ำทับทิมคั้นของสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

3. เพื่อทราบปริมาณวิตามินซี ในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

4. เพื่อทราบความสามารถของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีนต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

5. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของผู้บริโภคในการเลือกบริโภคน้ำทับทิมคั้นตลอดจนส่งเสริมให้น้ำทับทิมเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ วิเคราะห์โดยวิธี DPPH Assay

2. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมจากน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteau assay

3. วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4. ศึกษาสมบัติของน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride)) โดยใช้ดีเอ็นเอพลาสมิด pBluescript (II) SK- เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างทับทิมที่ใช้ในการวิจัยเป็นทับทิมไทยเมล็ดสีแดงและทับทิมจีนเมล็ดสีแดงจากตลาดนัด สหกรณ์กรมวิชาการเกษตร บางเขน กรุงเทพมหานคร ช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2554 ถึงเดือนพฤษจิกายน พ.ศ. 2554

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. **สารต้านอนุมูลอิสระ** (antioxidant) หมายถึง สารที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระทำให้สามารถยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชันของโมเลกุลเป้าหมาย ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และ ดีเอ็นเอ

2. IC_{50} **ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ** หมายถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50

3. IC_{50} **ของการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ** หมายถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

4. **สายพันธุ์** (cultivar) หมายถึง พืชที่ปลูกในแหล่งกำเนิดหรือพื้นที่เดียวกัน เช่น สายพันธุ์ไทยคือพืชที่มีต้นกำเนิดและปลูกในประเทศไทย สายพันธุ์จีนพืชที่มีต้นกำเนิดและปลูกในประเทศจีน

5. **โพลีฟีนอล** หมายถึง กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟลาวาน คือมีวงแหวนเบนซิน 2 วง จับกับคาร์บอนที่ต่อกัน 3 อะตอม

6. **วิตามินซี** ป็นวิตามินที่ ละลายได้ในน้ำ ร่างกายไม่สามารถที่จะสร้างขึ้นเองได้จึงจำเป็นต้องได้รับจากการรับประทานเข้าไป โดยแสดงสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี

7. **พลาสมิด** เป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิดโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มักมียีน (gene) ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ หรือสารที่มีประโยชน์กับแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น ทำให้มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

8. Dose dependent คือ ฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นตามการ เพิ่มขนาดยาที่ใช้ในการรักษา

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. **อนุมูลอิสระ** (Free radical)

อนุมูลอิสระ หมายถึง สารซึ่งมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) มากกว่า หรือเท่ากับหนึ่งอิเล็กตรอนในวงโคจรของโมเลกุล มีระดับพลังงานสูง เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Valko; et al. 2007: 44-48) นอกจากนี้ อนุมูลอิสระยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา autocatalytic ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระโมเลกุลใหม่ขึ้นมาเรื่อยๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างต่อเนื่อง (ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550: 4) การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. การแตกของพันธะโคเวเลนต์แบบโฮโมไลซีส (homolysis)

$$A : B \xrightarrow{\text{homolysis}} A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

2. การเพิ่มอิเล็กตรอนหนึ่งตัว ให้กับอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{\bullet -}$$

3. การสูญเสียอิเล็กตรอนหนึ่งตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{\bullet +} + e^{-}$$

การเพิ่มอิเล็กตรอนหนึ่งตัวให้กับโมเลกุลทั่ว ๆ ไปหรือโมเลกุลในระบบชีววิทยาจะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างต่อเนื่องมากกว่าหนึ่งปฏิกิริยา (Knight. 1999: 22-25) ทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไป

1.1 ชนิดของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระมีหลายชนิดแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive Oxygen Species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive Nitrogen Species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (Reactive Chlorine Species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite) ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องแสดงใน ตาราง 1 (โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. 2549: 1)

1.2 แหล่งของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระในเซลล์สิ่งมีชีวิต เกิดได้จากทั้งปัจจัยภายในและภายนอกร่างกาย ดั้งนี้

1.ปัจจัยภายในร่างกาย มาจากปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นตลอดเวลา ได้แก่ กระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ การกำจัดเชื้อแบคทีเรียโดยเม็ดเลือดขาว และกระบวนการ lipid peroxidation เป็นต้น (ปิยนันท์ เส็งประชา. 2547: 3)

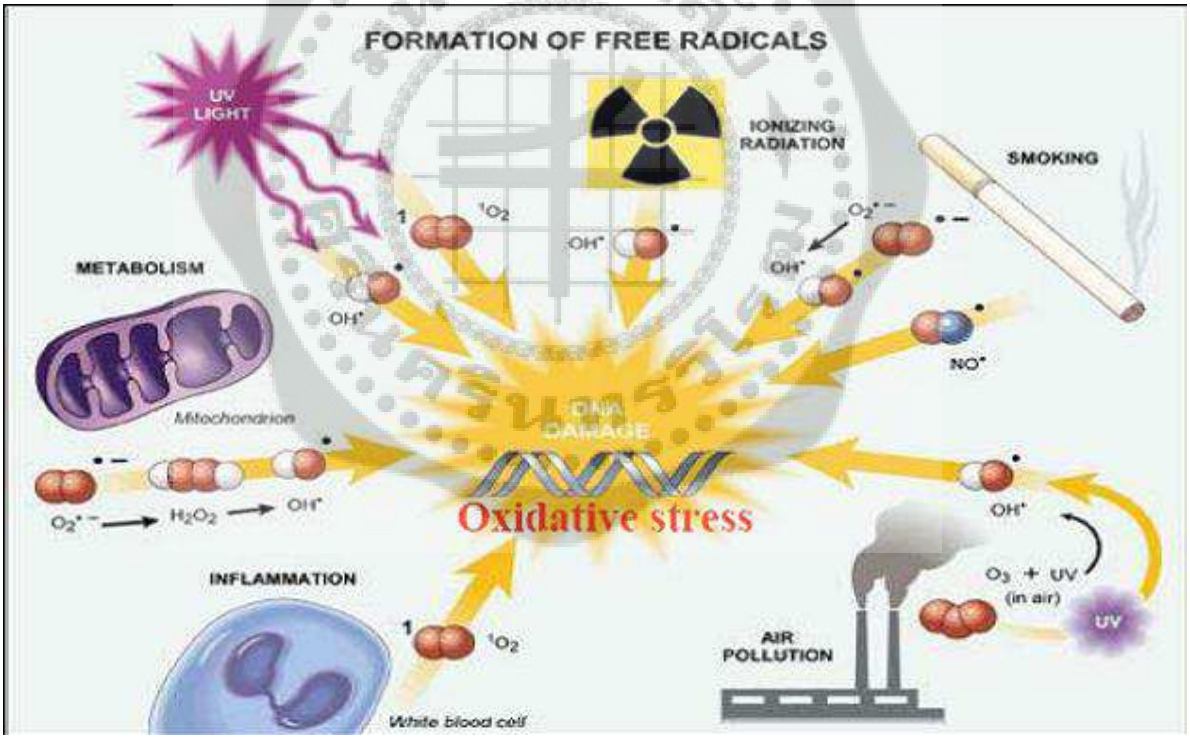
ตาราง 1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species (ROS, RS)	
Superoxide, Superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$)	H_2O_2, Ozone (O_3)
Hydroxyl ($HO^{\bullet}$)	Hypobromous acid (HOBr)
Hydroperoxyl ($HO_2^{\bullet}$)	Hypochlorous acid (HOCl)
Peroxyl ($RO_2^{\bullet}$)	Singlet oxygen ($O_2{}^1\Delta g$)
Alkoxyl ($RO^{\bullet}$)	Organic peroxides (ROOH)
Carbonate ($CO_3^{\bullet-}$)	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
Carbon dioxide ($CO_2^{\bullet-}$)	Peroxynitrous acid (ONOOH)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide ($NO^{\bullet}$)	Nitrous acid (HNO_2)
Nitrogen dioxide ($NO_2^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet-}$)	Nitrosyl cation (NO^+),Nitroxyl anion (NO^-)
	Dinitrogen tetroxide (N_2O_4)
	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
	Perxynitrous acid, (ONOOH)
	Nitronium (nitryl) cation, NO_2^+
	Alkyl peroxynitrites, ROONO
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine (Cl)	Hypochlorous acid (HOCl)
	Nitryl (nitronium) chloride (NO_2Cl)
	Chloramines Chlorine gas (Cl_2)
Others	
Thioyl radical ($RS^{\bullet}$)	

ที่มา: โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ.* หน้า 2.

2.ปัจจัยภายนอกร่างกาย ได้แก่ การได้รับพลังงานจากรังสีบางชนิด เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet radiation) รังสีเอ็กซ์ (X-ray) คลื่นอัลตราซาวนด์ (ultrasound) (Milowska ; & Gabryelak. 2007: 263-267) จากสารเคมีบางประเภท เช่น สารแปลกปลอมจากมลพิษ ควันไฟ หรือสารเคมีที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม (ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550: 4) จากการรับประทานอาหารประเภทสารพิษตกค้างจำพวกยาฆ่าแมลง ยากำจัดศัตรูพืช อาหารที่ใช้สารกันบูด สารแต่งสี แต่งกลิ่น สารเพิ่มความกรอบ การปรุงอาหารด้วยการทอดน้ำมันเดือด อาหารที่ปิ้งย่างจนเกรียมจัด อาหารที่รมควัน เป็นต้น

เมื่อใดที่ร่างกายได้รับการกระตุ้นจากภาวะที่ผิดปกติหรือได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่เป็นพิษ ร่างกายจะผลิตอนุมูลอิสระในปริมาณที่มาก จนไม่สามารถควบคุมได้ทำให้เกิดสภาวะเครียดของเซลล์ ที่เรียกว่า oxidative stress ทำให้อนุมูลอิสระส่วนเกินสร้างความเสียหายต่อชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ ดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลหนึ่งที่เกิดความเสียหายได้จนอาจมีผลเสียต่อพันธุกรรมของเซลล์ (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 แหล่งกำเนิดของอนุมูลอิสระนำไปสู่ความเสียหายของดีเอ็นเอ

ที่มา: ไบร์ท-ไบโอติค. (2554). *เอนไซม์ ผู้กำจัดอนุมูลอิสระ*. (ออนไลน์).

2. ผลเสียหายของการมีอนุมูลอิสระเกินในร่างกาย

การมีอนุมูลอิสระเกินสมดุล จะก่อให้เกิดปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น

2.1 ผลเสียหายต่อโปรตีน

อนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) สามารถเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ R ของกรดอะมิโนในโปรตีนที่มีความไวสูง เช่น ฮิสติดีน (histidine) กลายเป็นออกโซฮิสติดีน (oxohistidine) เมไทโอนีน (methionine) กลายเป็นเมไทโอนีนไดซัลฟอกไซด์ (methioninedisulphoxide) จึงมีผลทำให้โปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ ไม่สามารถทำงานได้หรือทำงานได้น้อยลง (Campanella; et al. 2007: 98-119)

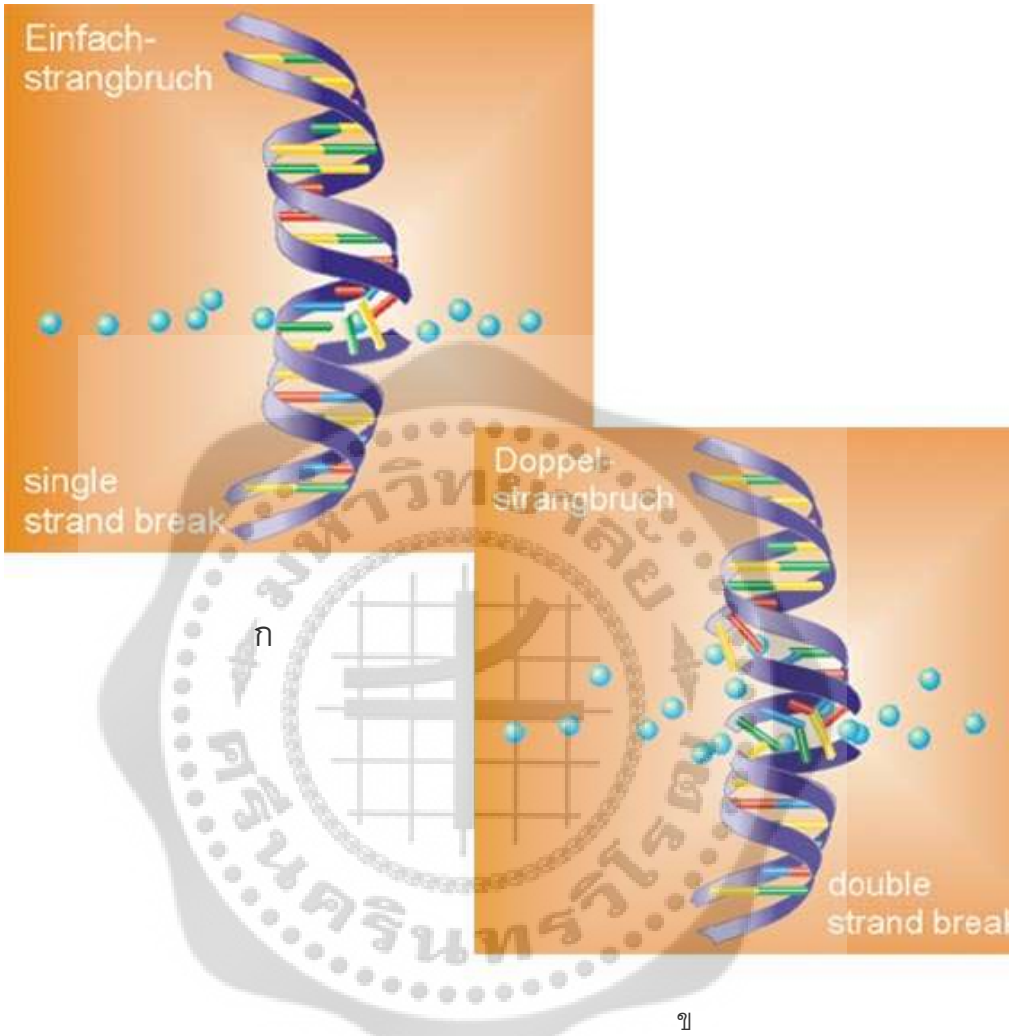
2.2 ผลเสียหายต่อลิพิด

อนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เนื่องจากลิพิดพวกนี้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง PUFA ง่ายต่อการถูกโจมตีโดยอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดผลเสียหายต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ และส่งผลกระทบทั้งต่อหน้าที่ในการลำเลียงสารผ่านเข้า-ออกและการทำงานของเอนไซม์บนเยื่อ ขณะเดียวกันการทำลายลิพิดดังกล่าว จะให้ผลิตผลเป็นอัลดีไฮด์โมเลกุลเล็กๆ ซึ่งทำปฏิกิริยาได้กับกรดอะมิโนในโปรตีนข้างเคียง ส่งผลเสียต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนตามมา นอกจากนี้ยังให้ผลิตผลเป็นลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (lipid hydroperoxide, LOOH) ซึ่งจะถูกไอออนโลหะเร่งให้เปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของลิพิดเปอร์ออกไซด์ (LOO^{-}) อนุมูลอิสระประเภทนี้คงสภาพอยู่ได้นานกว่าอนุมูลไฮดรอกซิลจึงส่งผลเสียหายเรื้อรังต่อเซลล์ (สุพร นุชดำรงค์. 2549: 97-102)

2.3 ผลเสียหายต่อดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจถูกโจมตีโดยอนุมูลอิสระนำไปสู่ความเสียหายได้หลายรูปแบบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของเบส หรือการทำลายเบสในบางจุด เช่น การขาดหายไปของเบส (deletion) ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน โดยการแปลรหัสของเบส 3 ตัวที่เรียกว่า โคดอน (codon) บน mRNA ถูกเลื่อนลำดับไป (frame shift) ทำให้ได้โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนผิดไป ส่งผลให้ได้โปรตีนที่มีการพับทบ (folding) ผิดรูปจนอาจสูญเสียการทำหน้าที่ หรือความเสียหายอาจเกิดจากการแตกหักของสายพอลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ทำให้สายดีเอ็นเอแหว่ง (nick) จนขาดออกจากกัน (strand break) ซึ่งอาจเกิดในสายเดียวหรือทั้ง 2 สาย (ภาพประกอบ 2) หรืออาจทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ระหว่างสายดีเอ็นเอและโปรตีนฮิสโตน (histone) (DNA protein crosslinking) ในนิวคลีโอโซมของโครโมโซม (ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550: 8) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังมีผลทำให้เกิดการเรียงตัวและจับคู่ใหม่ของโครโมโซม (chromosomal rearrangement) และการแลกเปลี่ยนซิสเตอร์

โครมาติด (sister chromatid) ในกระบวนการแบ่งเซลล์ ดังนั้น อนุมูลอิสระจึงเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (DNA damage) (Franco; et al. 2008: 6-11)



ภาพประกอบ 2 ความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

ก. ความเสียหายจากดีเอ็นเอสายเดียวทำให้เกิดการแหว่ง

ข. ความเสียหายจากดีเอ็นเอสองสายทำให้เกิดการขาดออกจากกันของสายดีเอ็นเอ

ที่มา : Sanchez; et al. (2011). *Alpha lipoic acid Protects Brain Cells–Antioxidant Mechanisms For Alzheimer's Prevention*. (online).

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในกระบวนการชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ได้แก่ การทำลายทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และตัวเซลล์เอง ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพเร็วกว่าปกติ ก่อให้เกิดความชราก่อนวัย (Bulteau; et al. 2006: 653-657) เกิดโรคแห่งความเสื่อมของร่างกาย เช่น โรคผนังหลอดเลือดแข็งตัว โรคหัวใจ ต้อกระจก การอักเสบของผิวหนัง นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยทำให้โรคพัฒนาไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงขึ้น (Manikandan; et al. 2006: 17-22) โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมและความบกพร่องของเซลล์ประสาทและโรคมะเร็ง (รัตนา สัมพันธชิต. 2552: 9-10)

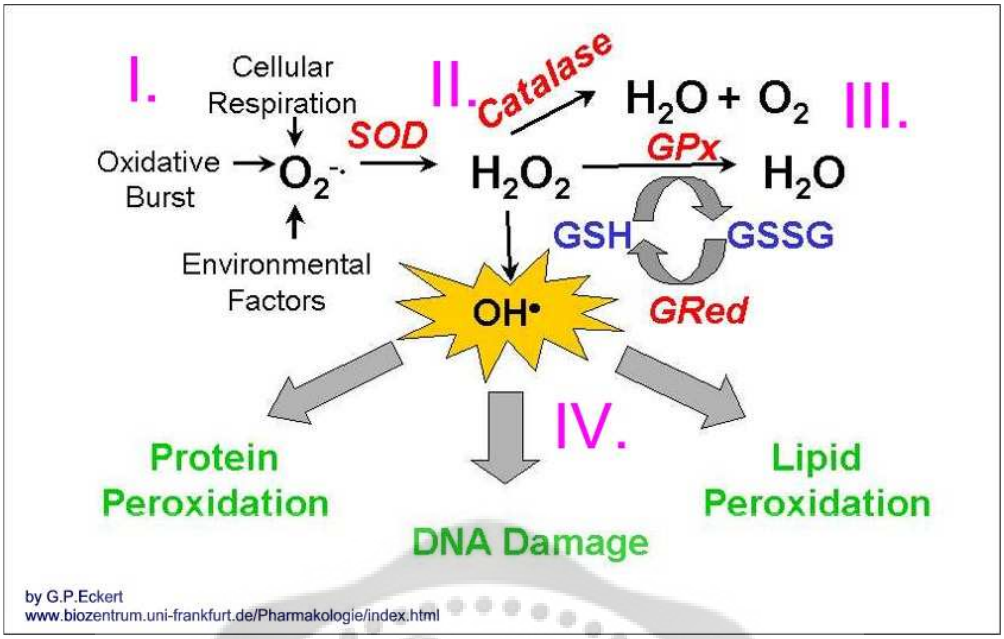
3. ระบบที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายให้อยู่ในสมดุล

โดยทั่วไปเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีกระบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งมีทั้งแบบที่ควบคุมโดยเอนไซม์ และแบบที่ควบคุมโดยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยแบบที่ควบคุมโดยเอนไซม์จะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น Superoxide dismutase (SOD), Catalase, Glutathione peroxidase, Ascorbate peroxidase, Monohydroascorbate, Dehydroascorbate, และ Glutathione reductase เป็นต้น (Huang; *et al*. 2007:166-172)

SOD, Catalase และ Glutathione peroxidase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในกระบวนการรักษาสมดุลอนุมูลอิสระของร่างกาย โดยจะทำงานต่อเนื่องกัน เริ่มจาก SOD เปลี่ยนอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งต้องถูกกำจัดออกไปทันทีเพื่อป้องกันไม่ให้เปลี่ยนเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) ที่เป็นอันตรายที่สุดของเซลล์ โดยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ catalase ทำหน้าที่สลาย H_2O_2 ไปเป็นออกซิเจนและน้ำ และ glutathione peroxidase ทำหน้าที่ถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก glutathione รูปรีดิวซ์ (GSH) ไปสู่โมเลกุลของ H_2O_2 (Campanella; et al. 2007: 98-119) กลายเป็น H_2O และ glutathione รูปออกซิไดส์ (GSSG) (ภาพประกอบ 3) ดังนั้นเอนไซม์ทั้ง 3 จึงช่วยให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่มีความเสถียรเพื่อหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระในระบบชีวเคมีของร่างกาย

สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติในเซลล์ ได้แก่ glutathione (GSH), lipoic acid, ceruloplasmin, albumin, transferrin, haptoglobin, hemopexin, uric acid, bilirubin และ cysteine เป็นต้น (ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550: 8-10)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ระบบของเอนไซม์หรือสารต้านอนุมูลภายในร่างกายจะควบคุมได้ ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ต่อเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้น เพื่อป้องกันการเกิด oxidative stress ขึ้นร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกอย่างพอเพียง (ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550: 9-10)



ภาพประกอบ 3 กลไกการป้องกันอนุมูลอิสระโดยเอนไซม์

ที่มา: ไมตรี สุทธจิตต์ (2554). *Generation of free radical, oxidative stress and their damaging properties*. (ออนไลน์).

4. สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สารที่สามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารชีวโมเลกุลในร่างกาย (ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550: 9-10) ทั้งนี้ สารต้านอนุมูลอิสระต้องมีความไวในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารชีวโมเลกุล เป้าหมาย และต้องสามารถยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญ (Black. 2004: 3169-3170)

ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ มีทั้งที่มาจากธรรมชาติ และที่มาจากการสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ กรดอะมิโน วิตามินซี (ascorbic acid) แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ เมลานอยดิน (melanoidin) โทโคฟีรอล (tocopherol) แทนนิน (tannins) เพปไทด์ (peptides) และกรดอินทรีย์อื่นๆ (ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550: 10-11) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มีหลายชนิด เช่น Trolox กรดแกลลิค (gallic acid) และ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) เป็นต้น อาจแบ่งประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระออกได้หลายแบบ ดังนี้

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบ่งได้ 5 ประเภท ดังนี้

1) **สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ** (Primary antioxidant) ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และโทโคฟีรอล สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยตรง โดยการให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลของอนุมูลอิสระให้เป็นสารที่มีความเสถียร

2) **สารต้านอนุมุลอิสระทุติยภูมิ** (Secondary antioxidant) ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropionic acid เป็นต้น สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่สลาย lipid hydroperoxide ซึ่งเป็นผลิตผลของ lipid peroxidation ให้กลายเป็นสารที่มีความเสถียร

3) **สารกำจัดออกซิเจน** (Oxygen scavenger) ได้แก่ วิตามินซี และอนุพันธ์ เช่น ascorbyl palmitate, erythorbic acid (isoascorbic acid) และ sodium erythorbate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ซึ่งจะเป็นการกำจัดโมเลกุลของออกซิเจนส่วนเกินในระบบ

4) **เอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ** (Enzymatic antioxidant) ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนและอนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

5) **สารคีเลทติง** (Chelating agent **หรือ** Sequestrant) ได้แก่ กรดซิตริก กรดอะมิโน และ EDTA เป็นต้น สารกลุ่มนี้จะทำหน้าที่จับกับไอออนของโลหะเช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียรได้ (อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544: 6)

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามลักษณะของสารที่พบ แบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

1. **สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ**

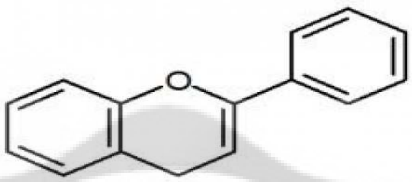
1.1 **สารประกอบฟีนอลิก** (Phenolic compound)

สารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกและมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น ถือเป็น secondary metabolites ของพืชผัก (โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. 2549: 123) พบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ไวน์แดง และทับทิม สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปสารประกอบโพลีฟีนอล มีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบโพลีฟีนอลกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารประกอบโพลีฟีนอล เป็นสารพฤกษเคมี (phytochemical) ที่สังเคราะห์โดยพืช ประกอบด้วย bioflavonoids เช่น anthocyanins, coumestanes, flavonoids,

isoflavonoids, stilbenes และ oligomeric polyphenols เช่น proanthocyanidins (ยูถิกา สร้อยระย้า. 2550: 13)

ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ จัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลิฟีนอลที่พบมากชนิดหนึ่ง มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาแวน (flavan) หรือ 2- ฟีนิลเบนโซไพเรน (2-phenylbenzopyran) โครงสร้างหลักจะคล้ายโครงสร้างของวิตามินอี (โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. 2549: 124) (ภาพประกอบ ที่ 4)



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของฟลาแวน

ที่มา: โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. หน้า 124.

ฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างต่างๆ (ภาพประกอบ ที่ 5) แบ่งได้เป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ คือ

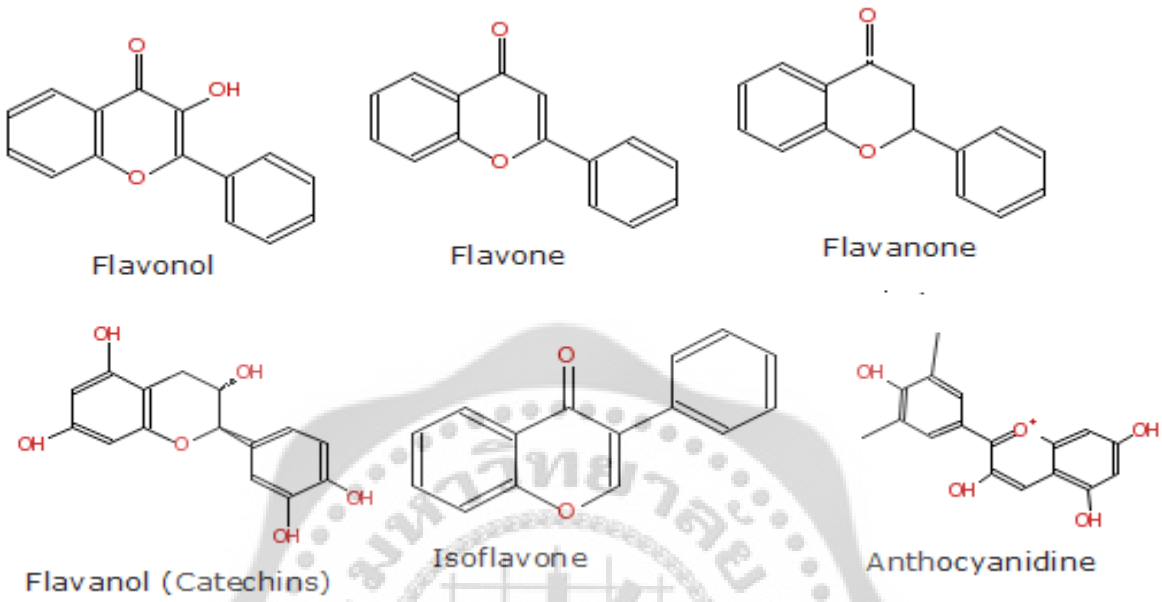
1. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin), แอนโทคลอร์ส (anthochlors) และออโรนัส (auronus) แอนโทไซยานิดิน เป็นรงควัตถุในพืชให้สีน้ำเงินแดง (red-blue) คือ ให้สีช่วงสีแดงถึงสีน้ำเงินขึ้นกับชนิดของพืช พบใน ทับทิม บลูเบอร์รี่ เชอรี่ องุ่นแดง หัวหอม กะหล่ำปลีสีม่วง เป็นต้น

2. ฟลาโวนอยด์ที่พบน้อย (minor flavonoid) ได้แก่ ฟลาโวโนน (flavonones) ฟลาวาน-3-ออล (flavan-3-ols) ไดไฮโดรฟลาโวน (dihydroflavone) และไดไฮโดรชาล์โคน (dihydrochalcones) กลุ่มนี้พบในพืชตระกูลส้ม (citrus)

3. ฟลาโวน (flavone) และฟลาโวนอล (flavonols) เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดของฟลาโวนอยด์ พบใน บลูเบอร์รี่ เชอรี่หวาน บรอคคอลี่ หัวหอม ชาดำ ชาเขียว ไวน์แดง มันฝรั่ง มะเขือเทศ แครอท ผักขม ส้ม ลูกแพร์ แอปเปิ้ล องุ่น เป็นต้น

4. ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) พบมากในพืชตระกูลถั่ว (*Leguminosae*; Legume) พวกนี้สามารถเปลี่ยนเป็นไอโซฟลาโวน (isoflavone) เทอโรคาร์แพนส์ (terocarpans) ไอโซฟลาวาน (isoflavans) และโรทีนอยด์ (rotenoid) ได้โดยทั่วไปจะรวมถึง เจนีสทีน (genistein) ไบโอชานิน เอ (biochanin a) และไดด์ซีน (daidzein)

5. แทนนิน (tannin) หรือโพรแอนโทไซยานิดิน เป็นสารประเภทโพลีฟีนอล (polyphenols) แทนนินสามารถเพิ่มค่าการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากสามารถจับกับโปรตีนได้ (ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่. 2549: 14-16)

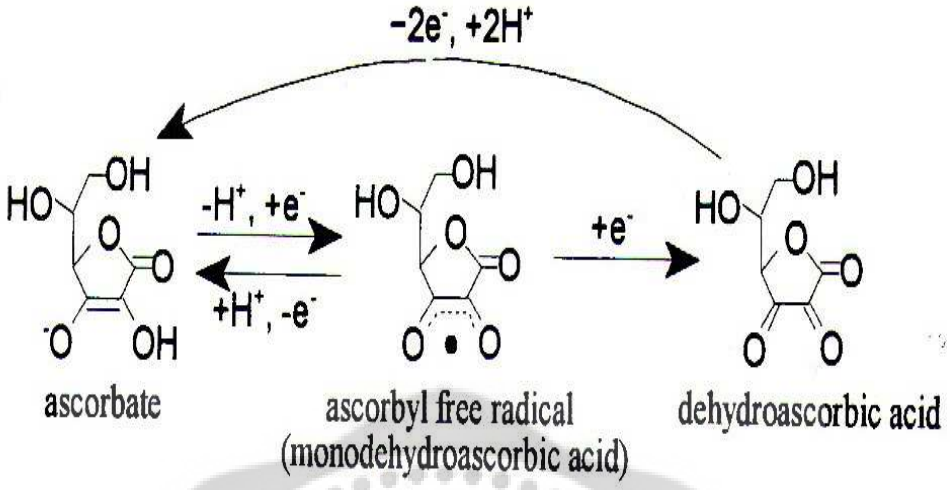


ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ที่มา : Lakhanpal; & Kumar Rai. (2011). *QUERCETIN: A VERSATILE FLAVONOID*. (online).

1.2. **วิตามินซี** (Ascorbic acid)

หรือกรดแอสคอร์บิค ในธรรมชาติจะพบในรูป L – Ascorbic acid มีคุณสมบัติเป็นสารที่รีดิวซ์เมื่อถูกออกซิไดส์แล้วจะเปลี่ยนไปเป็น L– dehydroascorbic acid มีฤทธิ์เป็นวิตามินเหมือนกัน และสามารถเปลี่ยนกลับไปมาระหว่างสารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ โดยอาศัยปฏิกิริยา oxidation-reduction (ภาพประกอบ 6) ที่ใช้เอนไซม์แอสคอร์บิคออกซิเดสและกลูตาไธโอนดีไฮโดรจีเนส (glutathione dehydrogenate) (สมทรง เลขะกุล. 2547: 113) สามารถละลายในน้ำได้ดี จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซี สามารถให้อิเล็กตรอนได้ 1 ถึง 2 อิเล็กตรอน จึงมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxyl (Combs. 1998: 246-269)

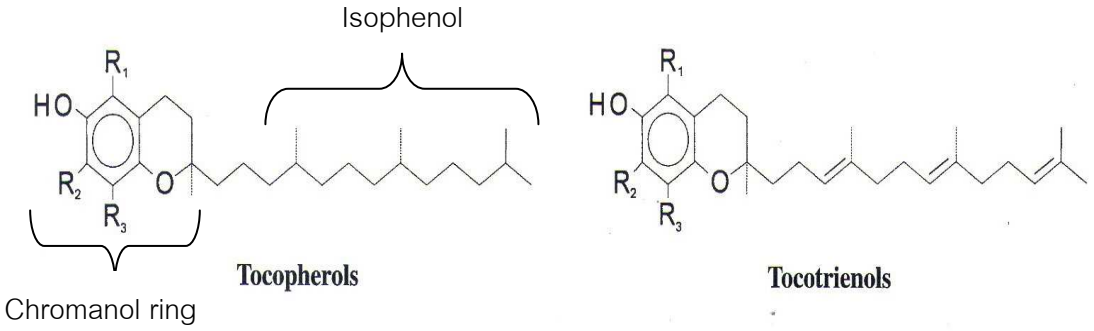


ภาพประกอบ 6 ปฏิกิริยา oxidation-reduction ของ วิตามินซี

ที่มา: Combs. (1998). *The vitamins fundamental aspects in nutrition and health*. p. 252.

1.3. วิตามินอี

เป็นวิตามินที่ไม่ละลายในน้ำจัดเป็นพวกเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) แบ่งเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ tocopherol และ tocotrienol ในโครงสร้างประกอบด้วย hydroxylate ring system (chromanol ring) และ isoprenoid side chain (ภาพประกอบ 7) แต่ละพวกแบ่งได้อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟ่า (α-) เบต้า (β-) แกมมา (γ-) และเดลต้า (δ-) ซึ่งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันในจำนวนและตำแหน่งของ CH_3 ที่ต่อกับวงเบนซิน (Combs. 1998: 52 - 54) โดยที่ แอลฟาโทโคฟีรอลแสดงสมบัติเป็นวิตามินอีได้แรงที่สุด วิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญภายในเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyl ช่วยลด lipid peroxidation ป้องกันการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อบุเซลล์ และโครงสร้างอื่นๆของเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ (สมทรง เลขะกุล. 2547: 89 - 90)



Vitamer	R_1	R_2	R_3
α-Tocopherol/α-tocotrienol	CH_3	CH_3	CH_3
β-Tocopherol/β-tocotrienol	CH_3	H	CH_3
γ-Tocopherol/γ-tocotrienol	H	CH_3	CH_3
δ-Tocopherol/δ-tocotrienol	H	H	CH_3
Tocol/tocotrienol	H	H	H

ภาพประกอบ 7 โครงสร้างทางเคมีของ สารกลุ่มวิตามินอี

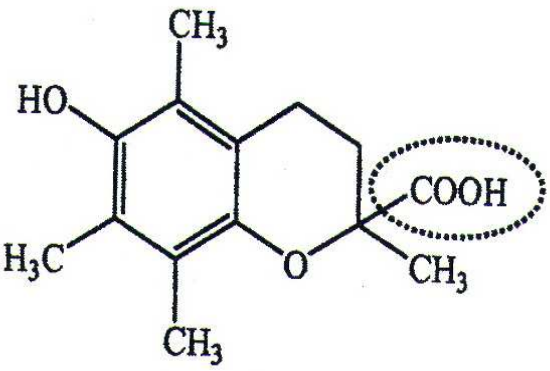
ที่มา: Combs. (1998). *The vitamins fundamental aspects in nutrition and health*. p. 52.

2. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบโมเลกุลขนาดเล็กและใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ที่ดีขึ้น (โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. 2549: 75) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ

2.1 Trolox (หรือ 6-hydroxy-2, 5, 7 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

เป็นอนุพันธุ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการแปลี่ยนสาย isoprenoid side chain เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก (ภาพประกอบ 8) ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี เป็นผลให้ออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ Trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันที ในการวิจัยส่วนใหญ่ จึงนิยมใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. 2549: 75-84)

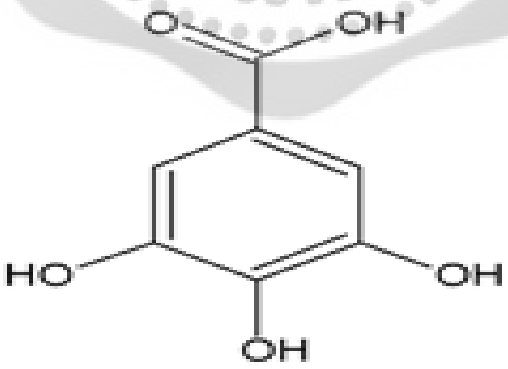


ภาพประกอบ 8 โครงสร้างทางเคมีของ Trolox

ที่มา: โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. หน้า 76.

2.2 Gallic acid (หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid)

เป็นสารประกอบอินทรีย์มีสูตร $C_7H_6O_5$ (ภาพประกอบ 9) Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี (สุิติกานต์ ปัญโญใหญ่. 2549: 16) ในการหาปริมาณของฟลาโวนอยด์ จึงมักใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid

ที่มา: Lansky ;& Newman. (2007). *Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*. p.180.

5. ทับทิม

ทับทิม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Punica granatum Linn.* อยู่ในวงศ์ (Family) *Punicaceae* มีชื่อสามัญ (local name) ที่เรียกกันในประเทศต่างๆ ดังนี้ อังกฤษ เรียก pomegranate สเปน เรียก granada จีน เรียก เซี๊ยะลิ้ว อาหรับ เรียก rimmond ฮินดู เรียก anar ประเทศไทย (ทั่วไทย) เรียก ทับทิม ประเทศไทย (อีสาน) เรียก พิลา พิลาขาว พิลาสี ประเทศไทย (เหนือ) เรียก มะเก๊าะ มะก่องแก้ว (ภาพประกอบ 10) (สมุนไพรไทยทางทันตกรรม. 2550: 124-126)

ก1. ผลทับทิมไทย

ข1. ผลทับทิมจีน

ก2. เปลือกและเมล็ดของทับทิมไทย

ข2. เปลือกและเมล็ดของทับทิมจีน

ภาพประกอบ 10 ผลทับทิม

ก ทับทิมสายพันธุ์ไทย (พิลา)

ข ทับทิมสายพันธุ์จีน (สายน้ำผึ้ง)

ถิ่นกำเนิดและบริเวณที่ปลูก (ยุพา สุชนชาติ. 2541: 25-26)

ทับทิมจัดเป็นไม้ผลเก่าแก่ที่มีประวัติยาวนาน มีหลักฐานยืนยันว่าได้มีการค้นพบทับทิมประมาณ 300 ปีก่อนคริสต์ศักราช มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียไมเนอร์ (บริเวณประเทศอิหร่านและใกล้เคียง) มีการกระจายพันธุ์ต่อเนื่องกันไปทางแนวทิศตะวันตกของประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศที่มีการปลูกทับทิม ได้แก่ ประเทศในเขตรอบๆทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศในตะวันออกกลาง ตะวันออกไกล ประเทศสเปน อิตาลี เลบานอน อิหร่าน อัฟกานิสถาน ปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา จีน และไทย เป็นต้น

พันธุ์ทับทิม (ยุพา สุชนชาติ. 2541: 25-26)

ทับทิมในประเทศไทย แบ่งกว้างๆ เป็น 3 ชนิด ดังนี้

1. ทับทิมใหญ่ *(Punica granatum Linn.)* เป็นทับทิมผลใหญ่ซึ่งปลูกเป็นไม้ผลและมีการทำเป็นสวนเพื่อการค้า เช่น พันธุ์ Wonderful พันธุ์อติชัย เด่นตะวัน แดงมารวย และเพชรชมพู เป็นต้น ซึ่งสามารถแยกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดเมล็ดแข็งและชนิดเมล็ดนิ่มซึ่งเหมาะต่อการบริโภคผลสด เนื้อในทับทิมแยกเป็นชนิดที่มีสีแดงอมชมพูกับชนิดที่ไม่มีสี หรือ ที่ชาวบ้านเรียกกันว่าทับทิมขาว กับทับทิมแดง โดย (ภาพประกอบ 10) ปกตินิยมปลูกพันธุ์ที่เนื้อมีสี เนื่องจากจำหน่ายได้ราคาดี ดึงดูดผู้บริโภค แม้ว่าจะมีความหวานน้อยกว่าทับทิมชนิดไม่มีสีก็ตาม

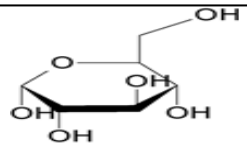
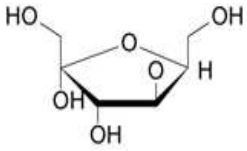
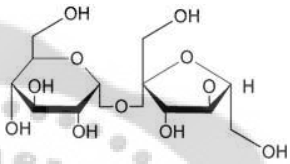
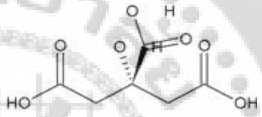
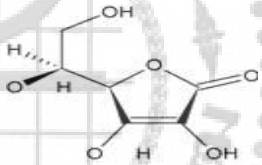
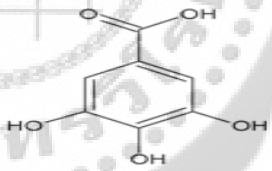
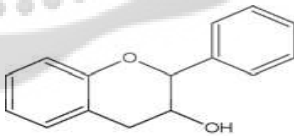
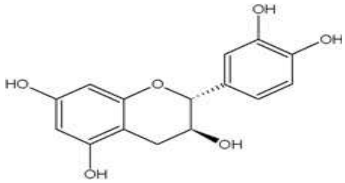
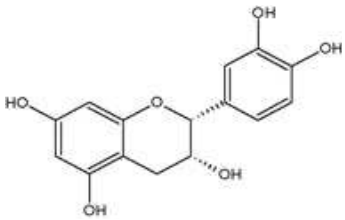
2. ทับทิมเล็ก *(Punica granatum var. nana Pers.)* เป็นทับทิมที่มีผลขนาดเล็ก ทรงพุ่มเล็ก ใช้ปลูกเป็นไม้ประดับ เรียกว่าทับทิมหนูไม่นิยมบริโภค มีข้อสันนิษฐานว่ามีการนำทับทิมเล็กเข้ามาในประเทศไทยโดยชาวจีน ในสมัยรัชกาลที่ 2 แห่งกรุงรัตนโกสินทร์

3. ทับทิมซ้อน *(Punica granatum var. nana Pers.)* เป็นทับทิมดอกซ้อนใช้ปลูกเป็นไม้ประดับ ทับทิมชนิดนี้ไม่มีผลเนื่องจากไม่มีเกสรตัวผู้ ดอกซ้อนกันแน่นเป็นพิเศษ ขนาดดอกใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-2.50 นิ้ว ดอกมีหลายสี สามารถบานอยู่ได้นาน 7-10 วัน ออกดอกแทบทั้งปี

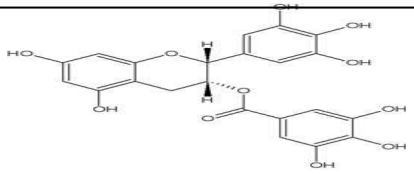
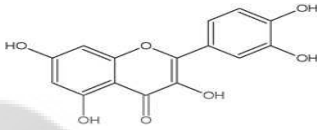
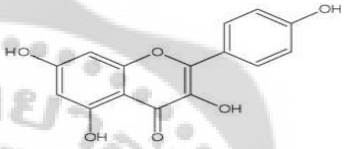
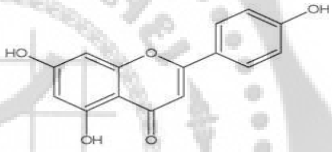
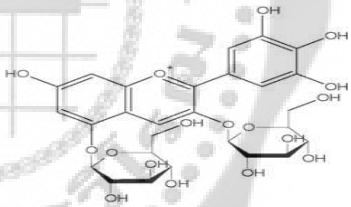
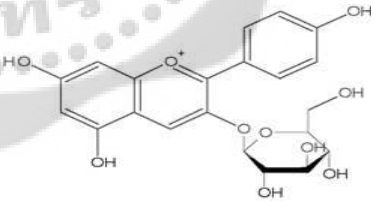
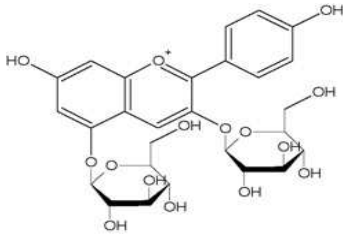
สารพฤษเคมีในผลทับทิม

สารพฤกษเคมีที่พบในผลทับทิมเป็นสารกลุ่ม pentose glycoside ,anthocyanin และ flavonols พบได้ในทุกส่วนของทับทิม แต่ในส่วนที่มีสารพฤกษเคมีมากจะพบในส่วนเปลือกและส่วนน้ำทับทิม เช่นสารกลุ่ม flavonols ที่พบได้แก่ Quercetin, Kaempferol สารกลุ่ม Anthocyanin ที่พบได้แก่ Cyanidin 3-*O*-glucoside, Cyanidin 3,5-di-glucoside, Cyanidin 3,5-di-O-glucoside, Delphinidin 3-O-glucoside, Delphinidin 3,5-O-glucoside, Pelargonidin-3,5-di-glucoside

ตาราง 2 กลุ่มของสารประกอบพฤกษเคมีที่พบในน้ำทับทิม

Chemical class	Compound name	Compound structure	Plant part
Simple sugars	Glucose		juice
Simple sugars	Fructose		juice
Simple sugars	Sucrose		juice
Aliphatic organic acids	Citric acid		juice
Aliphatic organic acids	Ascorbic acid		juice
Aliphatic organic acids	Gallic acid		juice
Flavan-3-ols	Flavan-3-ol		juice
Flavan-3-ols	Catechin		juice
Flavan-3-ols	Epicatechin		juice

ตาราง 2 (ต่อ)

Chemical class	Compound name	Compound structure	Plant part
Flavan-3-ols	Epigallocatechin 3-gallate (ECGC)		juice
Flavonols	Quercetin		juice
Flavonols	Kaempferol		juice
Flavones	Apigenin		juice
Anthocyanidins	Delphinidin 3,5-di-*O*-glucoside		juice
Anthocyanidins	Pelargonidin 3-*O*-glucoside		juice
Anthocyanidins	Pelargonidin 3,5-di-*O*-glucoside		juic

ที่มา: Lansky ;& Newman. (2007). *Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*. p.180-191.

Pelargonidin-3-glucoside และสารกลุ่ม pentose glycoside ได้แก่ glucose fructose sucrose critic acid Ascorbic acid เป็นต้น (Lansky ;& Newman. 2007: 177-206) (ตาราง 2)

ในการวิจัยใช้ส่วนน้ำที่คั้นจากเมล็ดทับทิม 2 สายพันธุ์ ทับทิมไทยเมล็ดสีแดง (พิลา) และทับทิมจีนเมล็ดสีแดง (สายน้ำผึ้ง)

6. การวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำทับทิมคั้น

1. การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

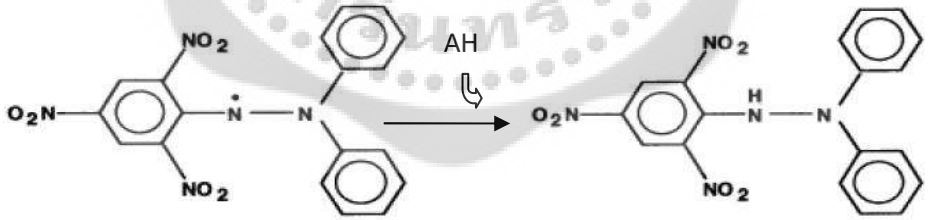
การวิเคราะห์มีหลายวิธี แต่วิธีที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือวิธี DPPH assay ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ของ 2,2 - diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) ซึ่งมีสีม่วงและมีความเสถียรในตัวทำละลายเมทานอล สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยให้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant, AH) หรือ radical species ($R^{\bullet}$) ไปรีดิวซ์ $DPPH^{\bullet}$ กลายเป็น DPPH-H หรือ DPPH-R ดังสมการที่ 1 และ 2 (Brand-William; et al. 1995: 25-30) (ดังภาพประกอบ 11)

$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH - H + A^{\bullet}$ ..... สมการ 1

สีม่วง สีเหลือง

$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$ ..... สมการ 2

สีม่วง สีเหลือง



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) 2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

สีม่วง สีเหลือง

โครงสร้างของอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ โครงสร้างของ $DPPH^{-}$

ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของอนุมูล DPPH

ที่มา: Molyneux. *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. p. 212.

2. การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลรวม

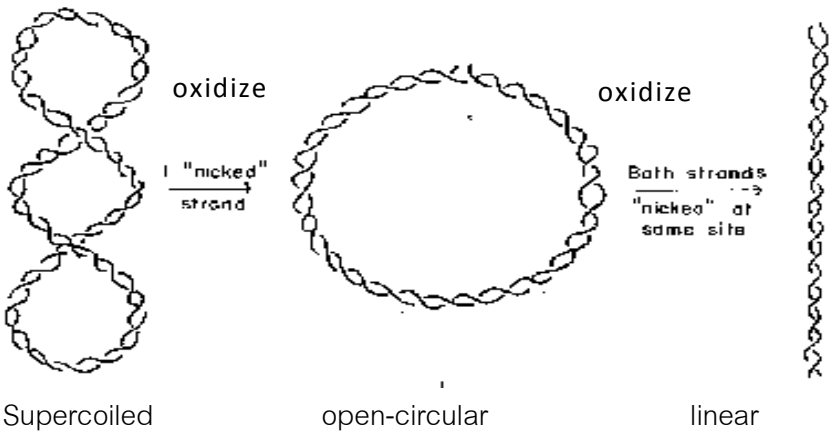
สารประกอบฟลาโวนอยด์ในผลทับทิมมีหลายชนิด ดังนั้นการหาปริมาณ จึงรายงานในรูปสารประกอบโพลีฟีนอลรวม (total phenolic compound) เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid วัดในหน่วยเป็น gallic acid equivalent (GAE) โดยให้สารประกอบโพลีฟีนอลทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteau reagent และ Na_2CO_3 (Singleton; et al. 1999: 152-178) ดังสมการ 3 และวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 765 nm นำไปหาปริมาณจากกราฟมาตรฐานของ Gallic acid (ปิยะนันท์ เส็งประชา. 2547: 11)

$$\text{Phenolic} + [P_2W_{18}O_{62}^{7-} + H_2P_2MO_{18}O_{62}^{6-}] \longrightarrow H_4P_2W_{18}^{8-} + H_6P_2MO_{18}O_{62}^{6-} \quad \text{สมการ 3}$$

(สีเหลือง) (สีน้ำเงิน)

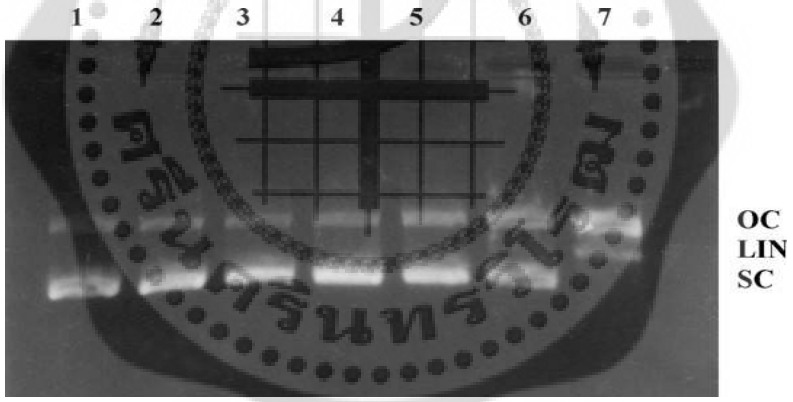
7. การศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอ เนื่องจากการถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ

พลาสมิดถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อศึกษาความเสียหายที่เกิดจากการขาดของสายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระตั้งแต่ปี 1987 โดยดัชนีที่วัดความเสียหาย คือการเปลี่ยนรูปร่างของ ดีเอ็นเอจากรูปธรรมชาติ supercoiled ไปเป็นรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ คือ หากสายดีเอ็นเอขาด 1 สายจะกลายเป็นรูป open-circular และหากขาด 2 สายจะกลายเป็นรูป linear (ภาพประกอบ 12) ซึ่งทั้ง 3 รูปมีอัตราการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของเจลอะกาโรส หรือเรียกว่า agarose gel electrophoresis แตกต่างกัน โดยดีเอ็นเอรูป supercoiled เคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่ารูป linear และ open circular ตามลำดับ ทำให้เห็นเป็น 3 แถบแยกกันบน agarose gel (ภาพประกอบ 13) เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณในแต่ละแถบจะสามารถคำนวณหาร้อยละของรูปธรรมชาติและรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติได้ (รัตนา สัมพันธชิต. 2552: 18-19; Zhang; & Omaye. 2001: 231-234)



ภาพประกอบ 12 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพลาสมิดเมื่อถูกออกซิไดส์ จากสภาพธรรมชาติ supercoiled ไปเป็นรูป open-circular และ linear

ที่มา: science-projects (2011). *F-Plasmid*. (online).



ภาพประกอบ 13 การเคลื่อนที่ของพลาสมิด pBR322 (รูปธรรมชาติ (SC, Supercoiled) และรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ 2 รูป (OC, open circular และ LIN, linear molecules)) ใน agarose gel electrophoresis

ที่มา: Hanif; et al. (2008). *The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA*. p. 21.

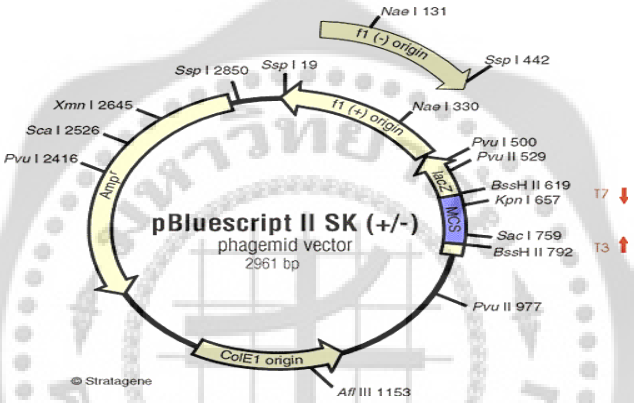
มีรายงานการใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ pBluescript ซึ่งมีขนาด 2961 base pair (ภาพประกอบ 14) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ 2,2'-azobis (2-amidinopropionyl hydrochloride, AAPH)

(ภาพประกอบ 15) เป็นอนุมูลอิสระที่ใช้ในการทำให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ มีกลไกการทำงานดังนี้ AAPH เมื่อสลายตัวด้วยความร้อนจะให้ alkyl radicals ($R^{\bullet}$) จากนั้น ($R^{\bullet}$) จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) ให้ alkylperoxyl radicals, ($ROO^{\bullet}$) ซึ่งจะเข้าไปออกซิไดซ์ดีเอ็นเอทำให้สายดีเอ็นเอขาด หากขาด 1 สายจะกลายเป็นรูป open-circular และหากขาด 2 สาย จะกลายเป็นรูป linear (Wei; & et al. 2006: 90-95) ดังสมการ 4-6

(AAPH) $R\text{-}N{=}N\text{-}R \longrightarrow N_2 + R + R^{\bullet}$ .....สมการ 4

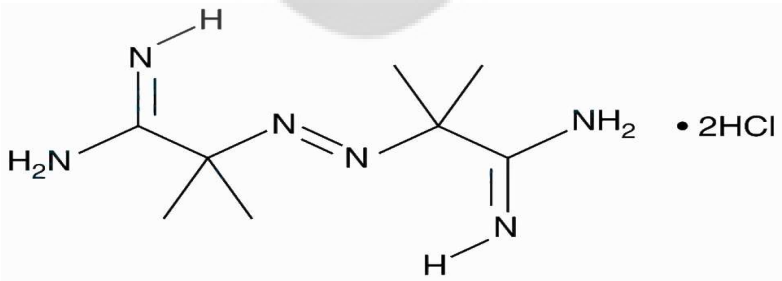
$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$ .....สมการ 5

$ROO^{\bullet} + DNA \longrightarrow$ DNA damage product + ROOH .....สมการ 6



ภาพประกอบ 14 พลาสมิด pBluescript II SK

ที่มา : Xenbase. (2011). *pBluescript II SK+/-*. (online).



ภาพประกอบ 15 โครงสร้างของ AAPH

ที่มา: รัตนา สัมพันธชิต. (2552). *ความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิดต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ*. หน้า 18.

ดังนั้น ผู้วิจัยใช้ pBluescript II SK- เป็นพลาสมิดต้นแบบ และ AAPH เป็นอนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหาย พลาสมิดดีเอ็นเอจึงเปลี่ยนรูปจาก supercoiled ไปเป็น open circular และ linear ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 รูปมีอัตราการเคลื่อนที่ใน Agarose gel electrophoresis แตกต่างกันดังกล่าวแล้ว เมื่อนำ 3 แถบไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เครื่อง gel documentation แล้วคำนวณหาปริมาณเป็นร้อยละของรูปธรรมชาติและรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำทับทิมคั้น ร้อยละของดีเอ็นเอรูปธรรมชาติจะสูงขึ้น ทำให้ทราบความสามารถของน้ำทับทิมคั้นในการยับยั้งความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีการวิจัยจำนวนมากได้รายงานถึงความสามารถของน้ำทับทิมคั้นสดในด้านการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยแคม; ไฮซิล; และเดอมัส (Cam; Hisil; &Durmaz. 2009: 721-726) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำทับทิมคั้นสด 8 ชนิด ต่อการต้าน lipid peroxidation ของไขมันที่ไม่อิ่มตัว linoleate (18:22,$\Delta^{9,12}$) ที่ถูกกระตุ้นโดยอนุมูลอิสระ 2 ชนิด คือ อนุมูล DPPH และ ABTS พบว่าน้ำทับทิมคั้นสดทั้ง 8 ชนิด แสดงความสามารถได้สูง โดยมีค่า EC_{50} (efficient concentration) เท่ากับ 29.8 ± 2.9 mL น้ำทับทิมคั้น/g DPPH และค่า EC_{50} ต่อการต้านอนุมูล ABTS รายงานเป็นสารมาตรฐาน Trolox (Trolox equivalent antioxidant capacity,TEAC) เท่ากับ 418.3 ± 5.2 mg TEAC ต่อ100 mL ตามลำดับ โดยพบปริมาณโพลีฟีนอลรวม เท่ากับ 208.3 - 343.6 mg CE (catechin equivalent) และแอนโทไซนินรวม เท่ากับ 8.1-36.9 mg CGE (cyanidine-3-glucoside equivalents) ต่อ100 mL ของน้ำทับทิม ตามลำดับ

ส่วนต่างๆของทับทิม ได้แก่ เปลือก น้ำคั้น และ เมล็ด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่เท่ากัน ริซซี; และคนอื่นๆ (Ricei; et al. 2006: 310-312) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผลทับทิม ที่เก็บมาจากตลาดเออไบโน (urbino) ในช่วงเดือน กันยายน ปี ค.ศ. 2004 ที่ปลูกในสวนสมุนไพรในมหาวิทยาลัยเออไบโน ประเทศตุรกี (มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 500 เมตร) โดยวัดความสามารถในการป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน 3 วิธี (DPPH Assay), 5-lipoxygeneage assay และ luminal/xanthine/xanthine oxidase system (Chemiluminescence assay) พบว่า ทับทิมที่ปลูกในประเทสตุรกีส่วนน้ำคั้นจะมีความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนเปลือกและส่วนของสารสกัดเมล็ดทับทิม ตามลำดับ

มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบของสารพฤษเคมีที่พบในน้ำทับทิมคั้น โดยมูซาวินีแจด; และคนอื่นๆ (Mousavinejad; et al. 2009: 1274-1278) รายงานการพบสารฟลาโวนอยด์กลุ่มแอนโทไซยานินในน้ำทับทิมคั้น 8 สายพันธุ์ ที่ปลูกในประเทศอิหร่าน คือพบสารกลุ่มแอนโทไซยานิน

delphinidin 3,5-diglucoside (372 -5301 mg/l) cyanidin 3,5-diglucoside (242 - 2301 mg/l) delphinidin 3-glucoside (49-1042 mg/l) และ pelargonidin 3,5- diglucoside (7-90 mg/l) ตามลำดับ และพบว่าสารกลุ่มนี้แสดงความสามารถต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH Assay โดยมีค่า EC_{50} ในช่วง 18 - 42 Trolox equivalent antioxidant capacity

นอกจากน้ำทับทิมคั้นจะแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆดังกล่าว ยังพบว่าส่วนเปลือกของผลทับทิมแสดงความสามารถในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของยีน (antimutagenic) ด้วย เนจิ; จายาพากาซา; และจีนา (Negi; Jayaprakasha; & Jena. 2003: 393-397) ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสมบัติการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ของยีน ของเปลือกทับทิม โดยการสกัดเปลือกทับทิมด้วย Soxhlet extractor แล้วนำสารสกัดมาศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติการเป็นสารต้านการก่อกลายพันธุ์ของยีน โดยใช้ sodium azide เป็นตัวกระตุ้น พบว่าอัตราส่วนสารสกัดเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 25, 50, 75 และ 100 µg/mL แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ใน plate พบว่าสารละลายทับทิมที่ความเข้มข้น 2500 µg/plate สามารถแสดงผลการยับยั้งการกลายพันธุ์ของยีนได้สูงสุด

จากรายงานการพบสารต้านอนุมูลอิสระจำนวนมากในผลทับทิม โดยเฉพาะส่วนน้ำคั้นจึงมีการนำน้ำทับทิมคั้นมาผลิตเป็นเครื่องดื่มสำเร็จรูป เพื่อสุขภาพ ทีคาน; และคนอื่นๆ (Tezcan; et.al. 2009: 873-877) ศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมสำเร็จรูป 7 ชนิดที่วางจำหน่ายในท้องตลาดประเทศตุรกี โดยวัดความสามารถในด้านการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ferric reducing capacity พร้อมกับการหาปริมาณโพลีฟีนอล ปริมาณกรดอินทรีย์ และปริมาณน้ำตาล พบว่าน้ำทับทิมสำเร็จรูปทุกชนิดมีปริมาณโพลีฟีนอลสูง และแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบปริมาณน้ำตาลกลูโคสฟรุกโตส และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ กรดที่พบมากที่สุดคือ กรดซิตริก (citric acid) และ กรดมาลิค (malic acid) นอกจากนี้ยังพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์น้ำทับทิมคั้นผสมผลไม้ชนิดอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยกอนซาเลส -โมลินา; โมเลโน; และการ์เซีย -วีเกอร์รา (Gonzalez-molina ; Moreno ; & Garcia-Viguera. 2009: 1364-1372) ได้ศึกษาเครื่องดื่มแนวใหม่ที่เป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมะนาวและน้ำทับทิมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน คือ 25% 50% และ 75% พบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ได้จากส่วนผสมทั้งสองมีความเสถียร แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุดที่อัตราส่วนน้ำทับทิมทิมต่อน้ำมะนาวเท่ากับ 75:25 (v:v) ดังนั้นจึงสามารถพัฒนาไปเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้ในอนาคต

น้ำผลไม้ที่จำหน่ายในท้องตลาด มีหลายชนิดต่างก็มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคต่างกัน จึงมีรายงานการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในด้านการต้านอนุมุลอิสระของน้ำผลไม้ดังนี้ ชางเจียง กู; และคนอื่นๆ

(Changjiang Guo; et al. 2008: 72-77) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำทับทิมและน้ำแอปเปิ้ลโดยให้กลุ่มตัวอย่างผู้สูงอายุจำนวน 26 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกบริโภคน้ำแอปเปิ้ล และกลุ่มที่ 2 บริโภคน้ำทับทิม เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ plasma antioxidant capacity, antioxidant enzymes, glutathione, malondialdehyde, oxidized low-density lipoprotein, carbonyls และ DNA damage ในเลือด พบว่ากลุ่มที่บริโภคน้ำทับทิมมีความสามารถของ plasma antioxidant ต่อการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงขึ้น และมีค่า plasma carbonyl ซึ่งเป็นดัชนีวัดความเสียหายของโปรตีนลดลง ในขณะที่ผู้บริโภคน้ำแอปเปิ้ลแสดงการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้น้อยมาก จึงกล่าวได้ว่าการบริโภคน้ำทับทิมมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าการบริโภคน้ำแอปเปิ้ล

นอกจากนี้ยังมีรายงานการเปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอลและวิตามินซี ในน้ำผลไม้ 11 ชนิด ของ มัสดาวี รีซ่า; และคนอื่นๆ (Mahdavi Reze; et al. 2010: 968-972) ซึ่งพบว่า ในน้ำทับทิมสดให้ปริมาณโพลีฟีนอลสูงสุด และน้ำส้มสดให้ปริมาณวิตามินซีสุงสุด คือ 24.51 ± 0.51 mg/100mL ส่วนในน้ำทับทิมสดให้ค่าปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 19.01 ± 0.15 mg/100mL และสำหรับผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้จะมีค่าน้อยกว่าน้ำผลไม้สด มัสดาวีสรุปว่าปริมาณวิตามินซีแปรผันตามปริมาณโพลีฟีนอลที่ตรวจพบทั้งหมด

วิตามินซีมักพบได้ทั่วไปในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว และแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือ การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง โดยอะบัว-อีเนนอิน เฮสสันวาย: และคนอื่นๆ (Aboul-Enein Hassan Y; et al. 1990: 31-37) ทำการแยกและวิเคราะห์ปริมาณ D และ L- Ascorbic acid ในน้ำผลไม้ 4 ชนิด โดยใช้ระบบ isocratic high-performance liquid chromatographic (HPLC) ผลปรากฏว่าสามารถแยกวิตามินทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้ดี โดยได้ค่า resolution factor *Rs* = 1.1, selectivity factor a = 1.32, และ capacity factor *k'* = 2.6 และ 3.44 สำหรับ D- และ L- Ascorbic acid ตามลำดับ และยังพบอีกว่าวิธีนี้เหมาะสำหรับวิเคราะห์ วิตามินซี ชนิด L- Ascorbic acid วราดุล ฉัตรทอง. (2552). วิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในน้ำผลไม้โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ใช้ระบบ isocratic พบว่ามีช่วงการตอบสนองของสัญญาณต่อความเข้มข้นเป็นเส้นตรงจาก 5 ถึง 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีค่าร้อยละของการคืนกลับมากกว่าร้อยละ 99 และ 98 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 20 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ วิธีที่ใช้นี้มีความสามารถวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ 0.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีความจำเพาะในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิคในตัวอย่างน้ำผลไม้และน้ำผลไม้ผสมที่มีจำหน่าย

มีรายงานการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้ไทยโดยเทคนิค HPLC โดย Chonlayut raweewan. (2006). หาปริมาณวิตามินในลูกยอและผลมะขามป้อมพร้อมผลิตภัณฑ์ของน้ำหมัก ของพืชทั้ง 2 ชนิด โดยเทคนิค HPLC พบปริมาณวิตามินซีเฉลี่ยเท่ากับ 0.08 และ 0.21 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และปริมาณวิตามินซีในน้ำหมักลูกยอและมะขามป้อม ณ เวลาต่างๆ กัน วันที่ 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90 วัน พบว่าวิตามินซีมีปริมาณลดลงและไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในวันที่ 90 ของการหมัก ปริมาณวิตามินซีในน้ำหมักลูกยอมีค่า 3.26 - 457.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณวิตามินซีในน้ำหมักลูกยอมีค่า 10.14 – 824.77 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

อนุมูลอิสระสามารถทำความเสียหายให้แก่ชีวโมเลกุลต่างๆ คือ โปรตีน ลิพิด และดีเอ็นเอ ความเสียหายของดีเอ็นเอจะนำไปสู่การเป็นมะเร็ง จึงมีการวิจัยที่ศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ พลามิดดีเอ็นเอจึงถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ คูมาร์; และชัตโตพัดติเย (Kumar ; & Chattopadhyay. 2007: 1377-1384) ได้ใช้ พลาสมิด pBluescript II SK(-) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการศึกษาความสามารถของสารสกัด pudina (*Mentha spicata*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของอินเดีย ในด้านการป้องกันการตัดสายดีเอ็นเอจากอนุมูล $OH^{\bullet}$ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัด pudina10 µg/mL สามารถแสดงการป้องกันดังกล่าวได้ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดโดยวีธี DPPH assay พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.47 µg/mL และมีปริมาณพอลีฟีนอลรวมรายงานเป็นปริมาณ gallic acid (Gallic acid equivalent GAE) เท่ากับ 500 µg GAE/mg ซึ่งแสดงว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด pudina มาจากสารประกอบพอลีฟีนอล มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร; ธัญลักษ์ ภูมิวัฒนะ; และภูริชญา สมภาร. (2550) ศึกษาการยับยั้งความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอ pBR 322 ที่ถูกชักนำโดยอนุมูลอิสระของสารสกัดจากบัวหลวง พบว่า สารสกัดบัวหลวงด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 มีศักยภาพในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ และที่ความเข้มข้นของสารสกัด 800 µg/mL สามารถยับยั้งความเสียหายของดีเอ็นเอได้ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานวิตามินซี ที่ความเข้มข้น 40 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รัตนา สัมพันธชิต. (2552). ได้ใช้พลามิด pBluescript เป็น ดีเอ็นเอต้นแบบของการศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ AAPH โดยใช้สารสกัดจากใบชาสายพันธุ์อัสสัม 3 ชนิด คือ ชาเขียว ชาอูหลง และชาดำ พบว่าสารสกัดจากชาเขียวแสดงความสามารถในการป้องกันความเสียหายได้สูงสุด โดยสูงกว่าชาอูหลงประมาณ 1.2 เท่า และสูงกว่าชาดำประมาณ 10 เท่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 182±15, 218±10 และ 15.20±61 mg ในใบชา ตามลำดับ เหว่ย; และคนอื่นๆ (Wei; et al. 2006: 90-95) ศึกษาการทำงานร่วมกันของสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกสารประกอบโพลีฟีนอลที่สกัดจากใบชาเขียว ได้แก่ (-)-epicatechin) (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), และ (-)-epigallocatechin gallate

(EGCG) ร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox ต่อการยับยั้งความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอจาก AAPH โดยวัดความเสียหายของพลาสมิดจากการเปลี่ยนรูป supercoiled ไปเป็นรูป open circular และ รูป linear ตามลำดับ พบว่า Trolox ช่วยเสริมการทำงานของโพลีฟีนอลในชาเขียวในด้านการยับยั้งดังกล่าว อย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยมี 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

2. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

3. วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน โดยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

4. ศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน ต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

อุปกรณ์และสารเคมี

สารตัวอย่าง

น้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์จีน

สารเคมีและวัสดุที่ใช้

สารมาตรฐาน

1. Trolox (Acros organic)
2. Gallic acid (Sigma)
3. L-Ascorbic acid (Merck)

ดีเอ็นเอต้นแบบ

1. Plasmid pBluescript (II) SK- (2961 bp)

อนุมูลอิสระ

1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals) (Sigma)
2. AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropion hydrochloride) (Sigma)

สารเคมี

1. Folin-Ciocalteau reagent (Sigma)
2. Sodium carbonate (Na_2CO_3)

3. Absolute ethanol
4. 1% TAE (Tris sodium acetate EDTA) บัฟเฟอร์ pH 8.5
5. Agarose gel (Amresco)
6. PBS (Phosphate buffer saline) pH 7.4
7. Ethidium bromide
8. Perchloric acid ($HClO_4$)
9. Phosphoric acid (H_3PO_4)
10. Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)
11. Deionized water

อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์

1. ผ้าขาวบาง ขนาด 4.0 x 4.0 ตารางเซนติเมตร
2. ที่คั้นน้ำผลไม้
3. Volumetric flask ขนาด 50 100 500 และ 1000 mL
4. Beaker ขนาด 50 100 250 และ 500 mL
5. Cylinder ขนาด 100 mL
6. Erlenmeyer flask 250 mL
7. หลอดทดลอง
8. Cuvette
9. Pipette ขนาด 1 2 5 และ 10 mL
10. Micropipette
11. Micropipette Tips
12. PCR Tube
13. ตู้แช่ -18 องศาเซลเซียส
14. ขวดพลาสติก
15. HPLC Vials พร้อมฝาปิด
16. Membrane syringe filter 0.45 µM
17. Column Symmetry ®C18 5µM, (3.9x150mm)
18. ขวดแก้ว Duran (สำหรับใส่ mobile phase HPLC)

เครื่องมือ

1. เครื่อง UV - Vis spectrophotometer (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-2401 PC)
2. เครื่อง HPLC-UV (quaternary pump) (ยี่ห้อ Agilent รุ่น1100 Hewlett Packard)
3. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) (ยี่ห้อ Wealtec Crop ประเทศ USA)
4. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสชนิดแนวนอน (ยี่ห้อ Wealtec Crop ประเทศ USA)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
7. Hot plate
8. เครื่องกำเนิดแสง UV
9. เครื่อง Gel Documentation (ยี่ห้อ Syngene รุ่น G-Box)
10. Software Gene tool (ยี่ห้อ Syngene)
11. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีทดลอง

การเตรียมตัวอย่างน้ำทับทิมคั้น

1. เลือกผลทับทิมทั้ง 2 สายพันธุ์ มาอย่างละ 5 ลูก ปอกเปลือก แกะเอาเฉพาะส่วนของเมล็ด

2. นำส่วนเมล็ดมาบีบคั้นด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้ กรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บส่วนน้ำคั้น วัดปริมาตร บันทึกผล

3. เจือจางน้ำทับทิมคั้นด้วยน้ำกลั่นตามอัตราส่วนต่างๆ โดยน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยเจือจางในอัตราส่วน 1:100 1:200 1:400 และ 1:800 และ น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนเจือจางในอัตราส่วน 1:50 1:100 1:200 และ 1:400 เรียกน้ำคั้นส่วนนี้ว่า น้ำทับทิมคั้นเจือจาง

1. การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นโดยวิธี DPPH (ดัดแปลงจากเคม; ไฮซิล; และเดอมัส: 2009)

1.1 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Trolox

1.1.1 เตรียมสารละลาย Trolox เข้มข้น 100 µg/mL โดยชั่ง Trolox 0.0100 g ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol

1.1.2 ปิเปตสารละลาย Trolox จากข้อ 2.1 ปริมาตร 0, 1.25, 2.50, 3.75, 5.00 และ 6.25 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol จะได้สารละลาย Trolox ที่มีความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 20 และ 25 µg/mL ตามลำดับ

1.1.3 ปิเปตสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5, 10, 20 และ 25 µg/mL ความเข้มข้นละ 2000 µL ลงในหลอดทดลองที่ 1-6 ตามลำดับ เติม 0.1 mM DPPH ปริมาตร 2000 µL ลงในทุกหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (A) ที่ความยาวคลื่น 517 nm

1.1.4 คำนวณ % Inhibition จากสูตร

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

1.1.5 พล็อตกราฟ ระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของ Trolox

1.1.6 จากกราฟหาค่า IC_{50}

1.2 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย (อัตราส่วน1:800)

1.2.1 ปิเปตน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยปริมาตร 0, 400, 800, 1200, 1600 และ 2000µL ลงในหลอดทดลองที่ 1-6 เติม Absolute ethanol ปริมาตร 2000, 1600, 1200, 800, 400 และ 0 µL ลงไปจากนั้น เติม 0.1 mM DPPH ปริมาตร 2000 µL ลงในทุกหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

1.2.2 คำนวณ % Inhibition จากสูตร

1.2.3 พล็อตกราฟ ระหว่าง % Inhibition กับ ปริมาตรน้ำทับทิมคั้นเจือจาง

1.2.4 จากกราฟหาค่า IC_{50}

1.3 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน (อัตราส่วน1:400)

1.3.1 ปิเปตน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนปริมาตร 0, 400, 800, 1200, 1600 และ 2000 µL ลงในหลอดทดลองที่ 1-6 เติม Absolute ethanol ปริมาตร 2000, 1600, 1200, 800, 400 และ 0 µL และเติม เติม 0.1 mM DPPH ปริมาตร 2000 µL ลงไปในทุกหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

1.3.2 คำนวณ % Inhibition จากสูตร

1.3.3 พล็อตกราฟระหว่าง % Inhibition กับ ปริมาตรน้ำทับทิมคั้นเจือจาง

1.3.4 จากกราฟหาค่า IC_{50}

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน (ดัดแปลงจากวิธีของปิยนันท์ เส็งประชา: 2547)

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

2.1.1 ชั่ง Gallic acid 0.0100 g ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 100 µg/mL

2.1.2 ปิเปตสารละลาย Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 100 µg/mL ปริมาตร 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ12.5 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 µg/mL ตามลำดับ

2.1.3 ปิเปตสารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้น 10-50 µg/mL ความเข้มข้นละ 0.4 mL ลงในหลอดทดลองเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2.0 mL ในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งพักไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 1.6 mL ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

2.1.5 สร้างกราฟมาตรฐานของ Gallic acid โดย พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้น (0-50 µg/mL) กับค่าการดูดกลืนแสง (A_{765})

2.2 การหาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย (อัตราส่วนการเจือจาง 1:70)

2.2.1 ปิเปตน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยเจือจางปริมาตร 0.4 mL ลงในหลอดทดลองเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 1.6 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.2.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

2.2.3 คำนวณปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวม เป็น Gallic acid equivalents (GAE)

2.3 การหาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน (อัตราส่วนการเจือจาง 1:50)

2.3.1 ปิเปตน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนเจือจางปริมาตร 0.4 mL ลงในหลอดทดลองเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2.0 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 1.6 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.3.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

2.3.3 คำนวณปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมเป็น Gallic acid equivalents (GAE)

3. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (ดัดแปลงจาก วราดุล ฉัตรทอง : 2552)

3.1 ใช้คอลัมน์ Symmetry® C18 และ mobile phase 5 mM potassium dihydrogen phosphate ใน 0.3% phosphoric acid run ระบบเป็น isocratic elution จัดระบบให้มีการชะดังตาราง 3

3.2 สร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซี

3.2.1 ชั่ง L-Ascorbic acid 0.0100 g ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 3% phosphoric acid จะได้สารละลาย L-Ascorbic acid เข้มข้น 100 µg/mL

3.2.2 ปิเปตสารละลาย L-Ascorbic acid เข้มข้น 100 µg/mL ปริมาตร 2.5, 5.0, 1.00, 20.0 และ 25.0 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วย 3% phosphoric acid จะได้สารละลาย L- Ascorbic acid เข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 50 µg/mL ตามลำดับ

3.2.4 นำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC และวิเคราะห์ด้วยดีเทคเตอร์ UV

3.2.4 ผลจากการแยกและวิเคราะห์ด้วย software ของเครื่อง (Agilent LC Solution) จะได้โครมาโทรแกรม พร้อมค่าต่างๆที่ระบุ retention time พื้นที่ และความสูงของแต่ละ peak และความเข้มข้นของสารในแต่ละ peak นั้น จากค่าพื้นที่ใต้ peak ที่ได้นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของ L- Ascorbic acid โดยพล็อตค่าระหว่างความเข้มข้นของ L- Ascorbic acid กับค่าพื้นที่ใต้ peak area

3.3 หาปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย

3.3.1 ปิเปตน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยปริมาตร 10 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL เติม 35% perchloric acid ปริมาตร 1 mL เขย่าให้เข้ากัน จากนั้น เติม 3% phosphoric acid จนครบปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.2 นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน Membrane filter ขนาด 45 µM ใส่ใน vials พร้อมฉีดเข้าเครื่อง HPLC และวิเคราะห์ด้วยดีเทคเตอร์ UV

3.3.3 คำนวณปริมาณวิตามินซี โดยนำค่าพื้นที่ใต้พีคของน้ำทับทิมเทียบกับกราฟมาตรฐานของ L- Ascorbic acid เป็น µg/mL

3.3.4 น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนทำซ้ำข้อ 3.3.1-3.3.3

3.3.5 ทำการยืนยันตำแหน่ง Retention Time ของวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้นโดยการ spike สารมาตรฐานวิตามินซี (100 µg/mL) ปริมาตร 10 mL ลงในสารละลายตัวอย่าง

ตาราง 3 ระบบของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน ซี ในน้ำทับทิมคั้น

Operation parameter	Conditions
Stationary phase	Symmetry® C18,5µM (3.9x150mm)
Mobile phase	5mM KH_2PO_4 in 0.3%H_3PO_4
Flow rate	0.5 mL.mim^{-1}
Wavelength	246 nm
Injection volume	10 µL

4. การศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้นต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ AAPH (ดัดแปลงจาก กูมา และคาโตคายา : 2007; รัตนา สัมพันธชิต : 2552)

การเตรียมสารสำหรับทำ gel electrophoresis

- plasmid DNA

เตรียม plasmid DNA (pBluescript (II) SK-) จากชุด Kit (ยี่ห้อQIAGEN, Germany) วัด OD ที่ 260 nm คำนวณความเข้มข้น plasmid จากค่า Specific extinction coefficient ($E^{1\%}_{1\,cm}$ = 200) แล้วเจือจาง plasmid ด้วย PBS บัฟเฟอร์ ให้ได้ความเข้มข้น 25 ng/µL

- phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 137 mM KCl เข้มข้น 2.7 mM Na_2HPO_4 เข้มข้น 8.1 mM และ KH_2PO_4 เข้มข้น1.5 mM

- AAPH ความเข้มข้น 80 mM ปริมาตร 25 mL

ชั่ง AAPH 0.5424 g ละลายใน PBS 25 mL แล้วเตรียม AAPH ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 5, 10, 20, 40 และ 80 mM โดยวิธี serial dilution

- Trolox ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 100 mL

ชั่ง Trolox 0.5006 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL คนจนกว่า Trolox ละลายหมด แล้วเตรียม Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.63,1.25, 2.5 และ 5.0mM โดยวิธี serial dilution

- สารละลายสำหรับใส่ในการทำ gel electrophoresis

1 % agarose gel ละลายใน TAE (40mM Tris, 20 mM sodium acetate และ 2 mM EDTA)

- Gel buffer : Tris/acetate/EDTA (TAE buffer)

- Loading buffer : 0.13% bromophenol blue และ 40% (w/v) sucrose
- Ethidium bromide 0.6 µg/mL

4.1 การศึกษาผลของความเข้มข้น AAPH ต่อความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอ

4.1.1 ปิเปตต์ พลาสมิด pBluescript ที่ละลายใน PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และ AAPH ที่ความเข้มข้น 5 10 20 40 และ 80mM ลงในหลอด PCR ปริมาตรตามตาราง 4 นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 90 นาที

4.1.2 นำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis ในสนามไฟฟ้า 20 V เป็นเวลา 1.30 ชม. ย้อมสีด้วย Ethidium bromide และล้างน้ำ

4.1.3 นำ agarose gel ที่แยกได้ไปถ่ายรูปด้วย gel documentation และวิเคราะห์ปริมาณ plasmid รูปต่างๆด้วย software syngene

4.1.4 นำข้อมูลไปคำนวณหาปริมาณร้อยละของโครงรูปพลาสมิด 3 โครงรูป คือ โครงรูป supercoiled โครงรูป open circular และโครงรูป linear

4.1.5 นำร้อยละของพลาสมิดโครงรูป open circular บวกกับโครงรูป linear จะได้ปริมาณเป็นร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ ส่วนโครงรูปที่ไม่ถูกทำลายสภาพ คือ โครงรูป supercoiled

4.1.6 พล็อตกราฟระหว่างปริมาณ AAPH กับร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายสภาพและไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ

ตาราง 4 การศึกษาความเข้มข้นของ AAPH ต่อการทำลายพลาสมิดดีเอ็นเอ

สารที่เติม (µL)	หลอดที่					
	1	2	3	4	5	6
pBluescript (II) SK- 25 ng/µL	5	5	5	5	5	5
PBS	20	10	10	10	10	10
AAPH 5 mM	-	10	-	-	-	-
AAPH 10 mM	-	-	10	-	-	-
AAPH 20 mM	-	-	-	10	-	-
AAPH 40 mM	-	-	-	-	10	-
AAPH 80 mM	-	-	-	-	-	10
	Incubate 37^{0}C, 90 นาที					
Gel loading buffer	5	5	5	5	5	5
Run agarose gel electrophoresis	หยด 20 µL ลงบน 1% agarose gel Run gel 20 V นาน 1.30 ชม.					
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที					
ล้างน้ำ	30 นาที					

4.2 การศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox ต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอ จากอนุมูล AAPH

4.2.1 ปิเปตต์ พลาสมิด pBluescript ที่ละลายในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 และ Trolox ที่ความเข้มข้น 0.63 1.25 2.5 และ 5.0 mM ลงในหลอด PCR ปริมาตรตามตาราง 5 นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

4.2.2 ปิเปตต์ 20 mM AAPH ลงในทุกหลอด หลอดละ 10 µL นำไป incubate ที่ 37° C นาน 90 นาที

4.2.3 นำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis ในสนามไฟฟ้า 20V นาน 1.30 ช.ม. ย้อมสีด้วย Ethidium bromide และล้างน้ำ

4.2.4 จากนั้นปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4.1.3-4.1.5

4.2.5 พล็อตกราฟระหว่างปริมาณ Trolox กับร้อยละของพลาสมิดโครงรูปที่ไม่ถูกทำลายและโครงรูปที่ไม่ถูกทำลาย

4.2.6 จากรูปกราฟหาค่า IC_{50} ของการป้องกันการทำลายพลาสมิด โดยหาค่าความเข้มข้นของ Trolox (mM) ที่ทำให้พลาสมิดอยู่ในโครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ 50%

ตาราง 5 การศึกษาผลของ Trolox ต่อการป้องกันการความเสียหายพลาสมิดดีเอ็นเอ จาก AAPH

สารที่เติม (µL)	หลอดที่					
	1	2	3	4	5	6
pBluescript (II) SK- 25 ng/µL	5	5	5	5	5	5
PBS	20	10	10	10	10	10
Trolox 0.63 mM	-	-	10	-	-	-
Trolox 1.25 mM	-	-	-	10	-	-
Trolox 2.5 mM	-	-	-	-	10	-
Trolox 5.0 mM	-	-	-	-	-	10
	Incubate 37^{0}C, 30 นาที					
AAPH 20 mM	-	10	10	10	10	10
Gel loading buffer	5	5	5	5	5	5
	Incubate 37^{0}C, 90 นาที					
Run agarose gel electrophoresis	หยด 20 µL ลงบน 1% agarose gel Run gel 20 V นาน 1.30 ชม.					
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที					
ล้างน้ำ	30 นาที					

4.3 การศึกษาผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอจากอนุมูล AAPH

4.3.1 นำน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:100 1:200 1:400 และ 1: 800 เท่า

4.3.2 ปิเปตต์ พลาสมิด pBluescript ในสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และสารละลายน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่ถูกเจือจาง 100 200 400 และ 800 เท่า ลงในหลอด PCR ปริมาตรตาม ตาราง 6 นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

4.3.3. ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2 - 4.2.4

4.3.4 พล็อตกราฟระหว่างอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำทับทิมคั้นกับร้อยละของพลาสมิดโครงรูปที่ถูกทำลาย และโครงรูปที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ

4.3.5 จากรูปกราฟหาค่า IC_{50} ของการป้องกันการทำลายพลาสมิด

ตาราง 6 การศึกษาน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอ จาก AAPH

สารที่เติม (µL)	หลอดที่					
	1	2	3	4	5	6
pBluescript (II) SK- 25 ng/µL	5	5	5	5	5	5
PBS	20	10	10	10	10	10
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย 1: 800 เท่า	-	-	10	-	-	-
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย 1: 400 เท่า	-	-	-	10	-	-
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย 1: 200 เท่า	-	-	-	-	10	-
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย 1: 100 เท่า	-	-	-	-	-	10
	Incubate 37^0C, 30 นาที					
AAPH 20 mM	-	10	10	10	10	10
Gel loading buffer	5	5	5	5	5	5
	Incubate 37^0C, 90 นาที					
Run agarose gel electrophoresis	หยด 20 µL ลงบน 1% agarose gel Run gel 20 V นาน 1.30 ชม.					
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที					
ล้างน้ำ	30 นาที					

4.4 การศึกษาผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอจากอนุมูล AAPH

4.3.1 นำน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 50 1:100 1:200 และ 1:400 เท่า

4.3.2 ปิเปตต์ พลาสมิด pBluescript ในสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 และสารละลายน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนที่ถูกเจือจาง 50 100 200 และ 400 เท่า ลงในหลอด PCR ปริมาตรตาม ตาราง 7 นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

4.3.3. ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2-4.2.4

4.3.4 พล็อตกราฟระหว่างอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำทับทิมคั้นกับร้อยละของพลาสมิดโครงรูปที่ถูกทำลาย และโครงรูปที่ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ

4.3.5 จากรูปกราฟหาค่า IC_{50} ของการป้องกันการทำลายพลาสมิด

ตาราง 7 การศึกษาน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอจาก AAPH

สารที่เติม (µL)	หลอดที่					
	1	2	3	4	5	6
pBluescript (II) SK- 25 ng/µL	5	5	5	5	5	5
PBS	20	10	10	10	10	10
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน 1: 400 เท่า	-	-	10	-	-	-
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน 1: 200 เท่า	-	-	-	10	-	-
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน 1: 100 เท่า	-	-	-	-	10	-
น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน 1: 50 เท่า	-	-	-	-	-	10
	Incubate 37^{0}C, 30 นาที					
AAPH 20 mM	-	10	10	10	10	10
Gel loading buffer	5	5	5	5	5	5
	Incubate 37^{0}C, 90 นาที					
Run agarose gel electrophoresis	หยด 20 µL ลงบน 1% agarose gel Run gel 20 V นาน 1.30 ชม.					
ย้อม Ethidium bromide	ย้อม gel 30 นาที					
ล้างน้ำ	30 นาที					

หมายเหตุ : ทุกการทดลอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการทดลองตามลำดับ ดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

การทดลองที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

การทดลองที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

การทดลองที่ 4 ผลการศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีนต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

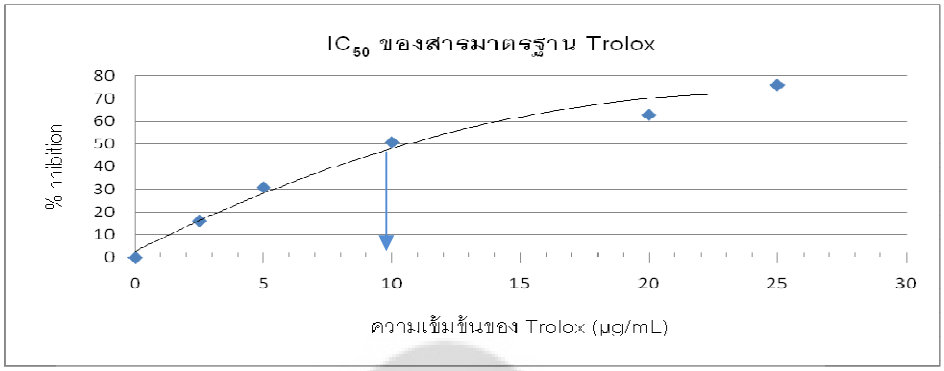
จากการเตรียมตัวอย่างน้ำทับทิมคั้นทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณน้ำทับทิมคั้นที่คั้นได้จากเมล็ดทับทิมสายพันธุ์จีนมีปริมาตรมากกว่าสายพันธุ์ไทย ประมาณ 2.2 เท่า (128 มิลลิลิตร และ 64 มิลลิลิตรต่อลูก ตามลำดับ) เนื่องจากทับทิมสายพันธุ์จีนมีขนาดลูกใหญ่กว่าและให้เมล็ดทับทิมมากกว่า

1. ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีนในการยับยั้ง DPPH radical

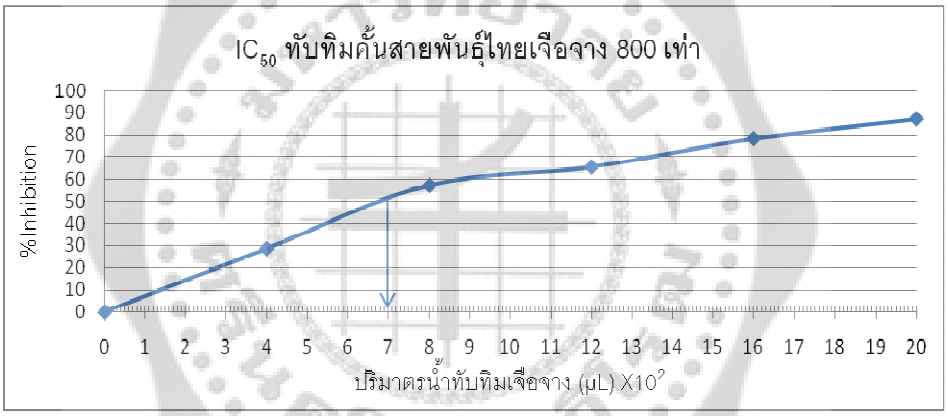
DPPH radical เป็นสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เมื่อละลายในเมทานอล จะให้สารละลายสีม่วง และเมื่อรับ hydrogen radical ($H^{\bullet}$) จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 nm

จากการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 - 25 µg/mL) หรือน้ำทับทิมคั้นทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ไทยเจือจาง 800 เท่า และ สายพันธุ์จีนเจือจาง 400 เท่าที่ปริมาตรต่างๆ (0 - 2000 µL) ทำปฏิกิริยากับ 0.1 mM DPPH radical และวิเคราะห์ค่า IC_{50} จากกราฟที่พล็อตระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้น Trolox หรือปริมาณของน้ำทับทิมเจือจาง พบว่าTrolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.03 ± 0.15 µg (ภาพประกอบ 16ก) ส่วนน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยเจือจาง 800 เท่า และสายพันธุ์จีนเจือจาง 400 เท่า สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ 50% ที่ปริมาตร 710 µL (ภาพประกอบ 16ข)และ 905 µL(ภาพประกอบ 16ค) ซึ่งคำนวณเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 0.89 ± 0.02 µL

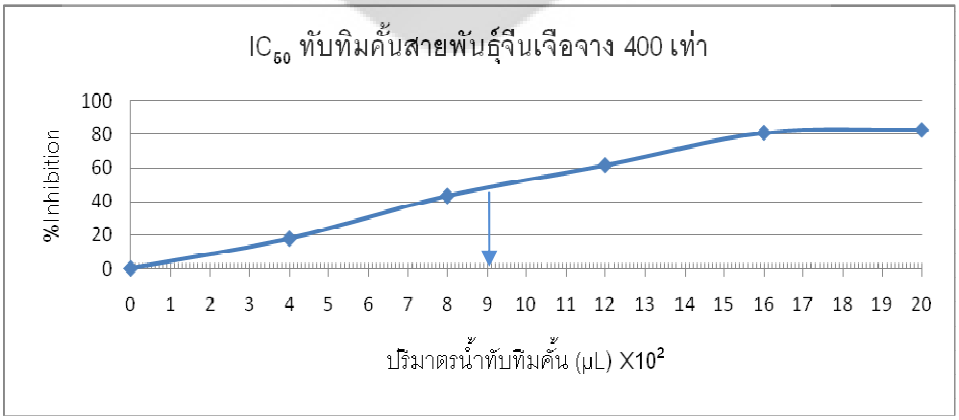
และ 2.26 ± 0.03 µL ตามลำดับ(ตาราง 8) แสดงว่า น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าสายพันธุ์จีน ประมาณ 2.5 เท่า



ก. การหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox



ข. การหาค่า IC_{50} ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย

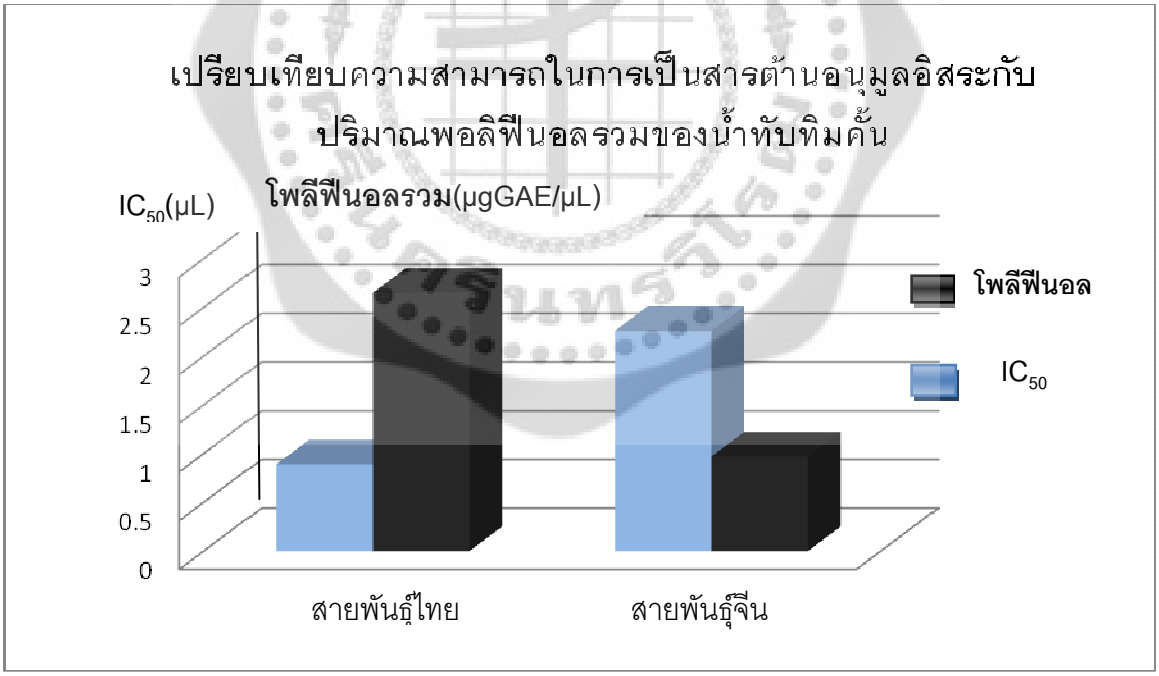


ค. การหาค่า IC_{50} ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน

ภาพประกอบ 16 การหาค่า IC_{50} ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

จากการนำน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์สารประกอบโพลีฟีนอลรวมโดยใช้ gallic acid เป็นโพลีฟีนอลมาตรฐาน โดยนำน้ำทับทิมคั้นทั้ง 2 สายพันธุ์ทำปฏิกิริยากับ Folin-ciocalteau regent และ Na_2CO_3 จะได้สารประกอบเหลืองและสีน้ำเงิน ตามลำดับ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm สร้างกราฟมาตรฐานของ gallic acid จากค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของปริมาณ gallic acid ได้สมการเส้นตรง $y = 0.0105x + 0.0258$, ($R^2 = 0.9977$) (ภาพประกอบ 30 ในภาคผนวก ข) พบว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมสูงกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนเกือบ 2.7 เท่า คือมีปริมาณ 2.65 ± 0.02 µgGAE/µL และ0.97 ± 0.01 µgGAE/µL ตามลำดับ (ตาราง 8) จากผลการทดลอง พบว่าปริมาณโพลีฟีนอลรวมสอดคล้องกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH คือมีปริมาณโพลีฟีนอลรวมมากจะใช้สารปริมาณน้อยในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ17 กราฟแท่งเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณโพลีฟีนอลรวมในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน

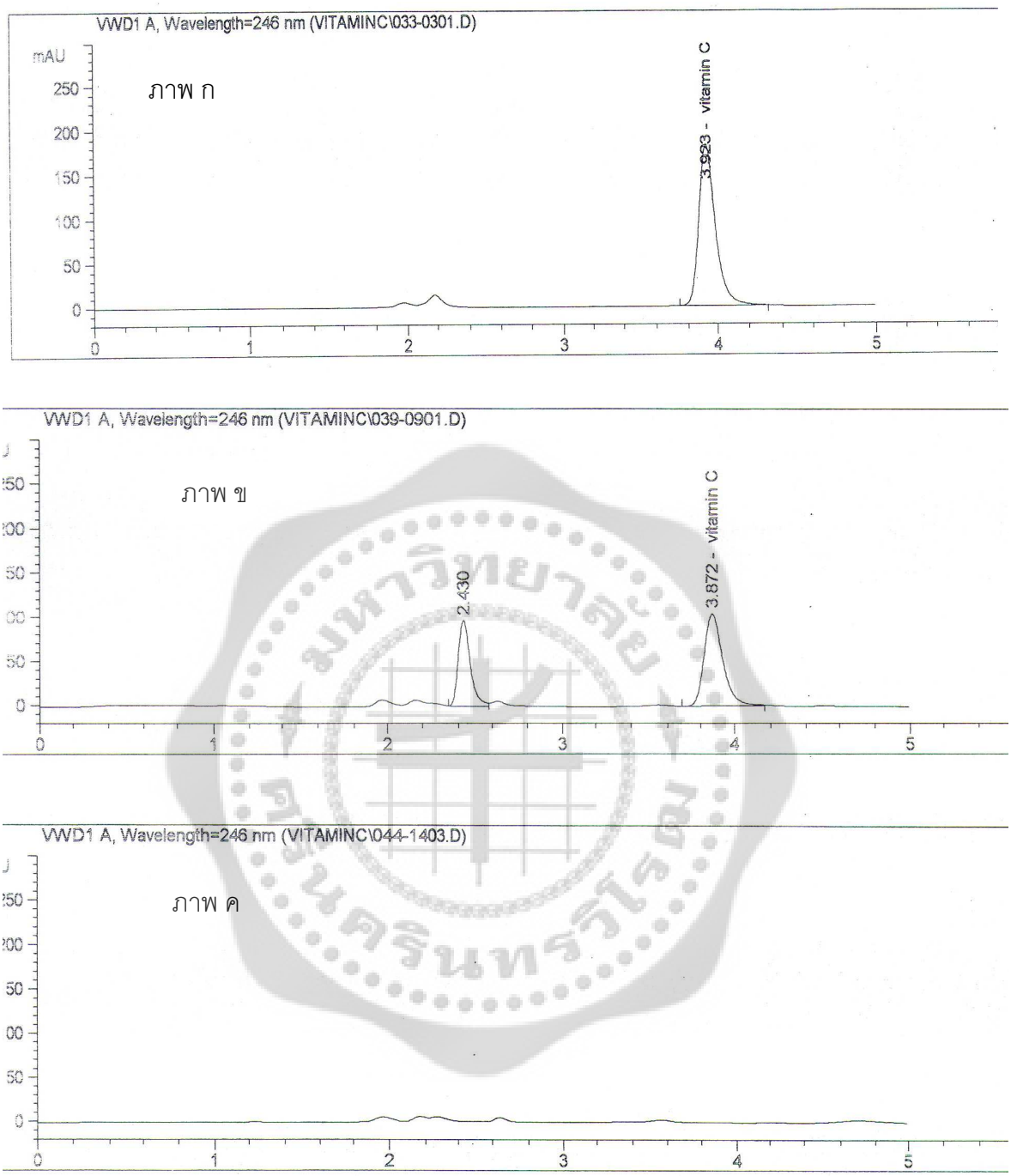
3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากการนำน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Agilent รุ่น 1100 Hewlett Packard) ตรวจวัดด้วย UV วิเคราะห์ในระบบ Reversed phase ใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 5 mM NaH_2PO_4 ใน 0.3% H_3PO_4 คอลัมน์ Symmetry® C18 5 µM, (3.9x150mm) ความยาวคลื่น 246 nmเมื่อนำสารละลายมาตรฐานวิตามินซีและน้ำทับทิมคั้นทั้ง 2 สายพันธุ์ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จากการวิเคราะห์ด้วย software ของเครื่องจะให้ข้อมูลเป็นโครมาโทแกรม (ภาพประกอบ 18) และพารามิเตอร์ต่างๆ (ภาพประกอบ 31 ภาคผนวก ข) สามารภคำนวณปริมาณวิตามินซี จากสมการ Y = 67.328X + 5.745, (R^2 = 9989) ซึ่งพล็อต ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซี พบว่า ในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีวิตามินซี โดยมีค่าเท่ากับ 0.122 ± 0.00 µg/µL แต่ในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนไม่สามารถตรวจพบวิตามินซี (ตาราง 8) และยืนยันตำแหน่ง Retention Time โดยการ spike สารมาตรฐาน L- Ascorbic acid ความเข้มข้น 100 µg/mL ปรากฏว่า peak height สูงขึ้น และได้ peak area ที่เพิ่มขึ้น (997.68 และ 1196.76) แสดงว่าตำแหน่ง Retention Time ของสารมาตรฐานและสารละลายน้ำทับทิมคั้นเป็นตำแหน่งเดียวกัน (ภาพประกอบ 35 ภาคผนวก ข)

ตาราง 8 ค่า IC_{50} ของการยับยั้งอนุมูล DPPH ปริมาณโพลีฟีนอลรวม และปริมาณวิตามินซีของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน และสารมาตรฐาน Trolox

น้ำทับทิมคั้น	IC_{50} (µL)	โพลีฟีนอลรวม (µgGAE/µL)	ปริมาณวิตามินซี (µg/µL)
สายพันธุ์ไทย	0.89 ± 0.02	2.65 ± 0.02	0.122 ± 0.00
สายพันธุ์จีน	2.26 ± 0.03	0.97 ± 0.01	ND
Trolox (µg)*	10.03 ± 0.15	_	_

ND = ตรวจไม่พบ



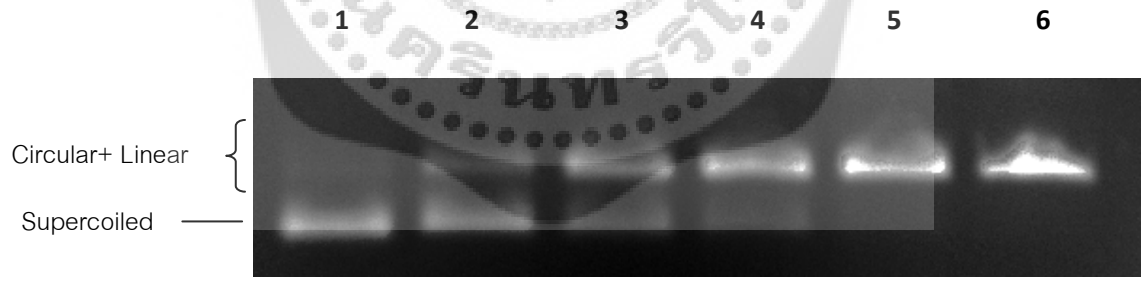
ภาพประกอบ 18. เปรียบเทียบโครมาโทรแกรมของการแยกวิตามินซี (L-Ascorbic acid) โดยวิธี Reversed phase ด้วย คอลัมน์ Symmetry® C18 5µM ของสารมาตรฐานและน้ำทับทิมคั้น ก. L-Ascorbic acid มาตรฐาน ข. น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย ค. น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน

4. ผลการศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีนต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

4.1 ความเข้มข้นของ AAPH ที่มีผลต่อการทำลายของพลาดมิด pBluescript

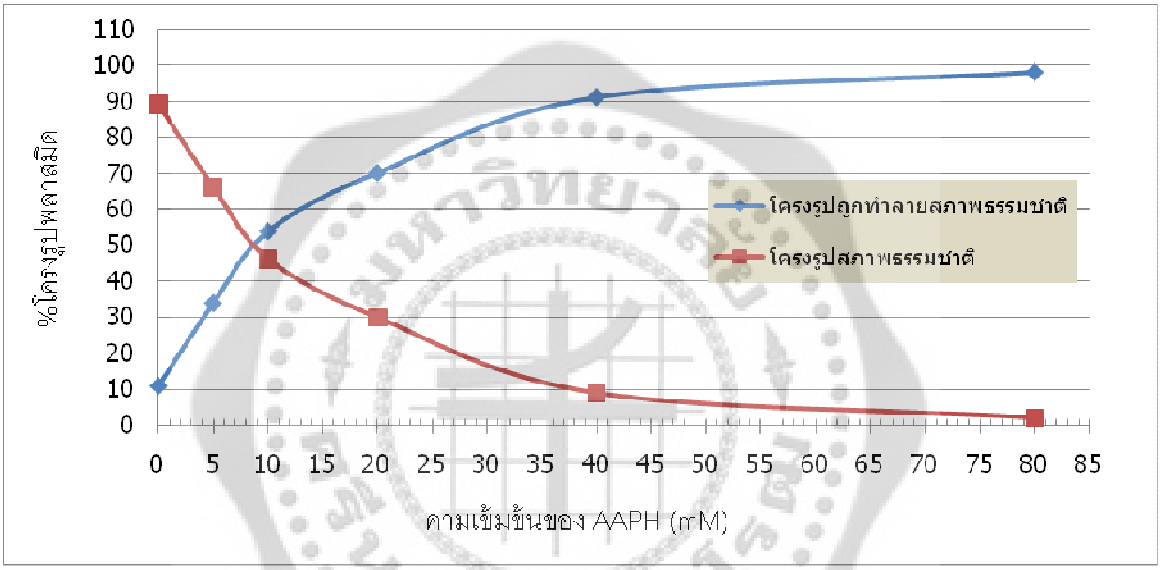
จากการนำอนุมูลอิสระ AAPH ที่ความเข้มข้น 5 10 20 40 และ 80 mM มาชักนำให้เกิดการทำลายพลาสมิด pBluescript (II) SK- ทำให้เปลี่ยนสภาพจาก supercoiled ไปเป็นโครงรูป open circular และ linear ตามลำดับ ซึ่งแยกออกจากกกันได้ในสนามไฟฟ้าของ agarose gel electrophoresis โดย พลาสมิดโครงรูป supercoiled จะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าโครงรูป linear และ open circular ตามลำดับ เมื่อนำ agarose gel ที่แยกได้ไปวิเคราะห์ gel documentation ด้วยเครื่อง Syngene รุ่น G-Box ประกอบด้วยการถ่ายภาพเจลด้วย software Genesnap (ภาพประกอบ 19) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Software Gene tool ซึ่งจะให้ข้อมูลของแต่ละแถบเป็นปริมาณในรูป raw volume (ตาราง 10 ภาคผนวก ข) แล้วนำข้อมูลไปคำนวณหาปริมาณเป็นร้อยละของพลาสมิด โครงรูปธรรมชาติคือ โครงรูป supercoiled และโครงรูปเสียสภาพคือ open circular และ linear รวมกัน แล้วพล็อตกราฟระหว่างปริมาณ AAPH กับร้อยละของโครงรูปสภาพธรรมชาติและโครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบ 20)

ผลการวิจัยพบว่าความเสียหายของพลาสมิดมีลักษณะแปรตามปริมาณของ AAPH ที่ใช้หรือเรียกว่า dose dependent



ภาพประกอบ 19 รูปแบบ agarose gel electrophoresis ของพลาสมิด pBluescript (II) SK- (25ng/μL) ปริมาตร 10 μL ทำปฏิกิริยากับ AAPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 μL ใน PBS pH7.4 ปริมาตร 10 μL ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 ; ควบคุม; Lane 2 : 5 mM AAPH; Lane 3: 10 mM AAPH; Lane 4: 20 mM AAPH; Lane 5: 40 mM AAPH; Lane 6: 80 mM AAPH

จาก ภาพประกอบ19 พบแถบการแยกเพียง 2 แถบ เนื่องจากการวิจัยได้ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 20 V (ซึ่งต่างจากที่ใช้ในการวิจัยของคูมาร์และชัดโตพัดติเยที่ใช้ที่ 50 V) ซึ่งเป็นกระแสไฟที่น้อยไป ทำให้เห็นเป็น 2 แถบโดยแถบที่ไกลที่สุดคือโครงรูปธรรมชาติ supercoiled และอีกแถบหนึ่งเป็นโครงรูปที่ถูกทำลาย 2 โครงรูป คือ linear และ open circular ซึ่งแยกจากกันไม่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามไม่มีผลต่อการคำนวณร้อยละโครงรูปที่ถูกทำลาย เนื่องจากเป็นผลรวมของ linear และ open circular ดังนั้นจึงยังคงสามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้



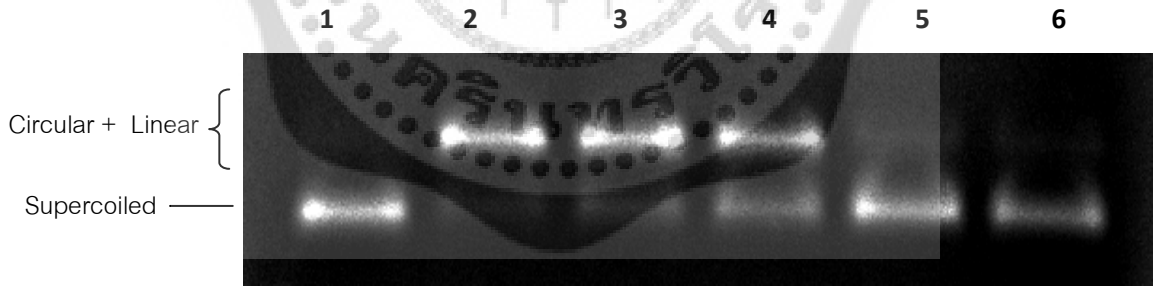
ภาพประกอบ 20 ปริมาณร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript (II) SK- ที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (open circular + linear) และ ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (supercoiled) แปรตามสภาพของ AAPH ที่เพิ่มขึ้น

4.2 ความสามารถของ Trolox ต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิด pBluescript จาก AAPH

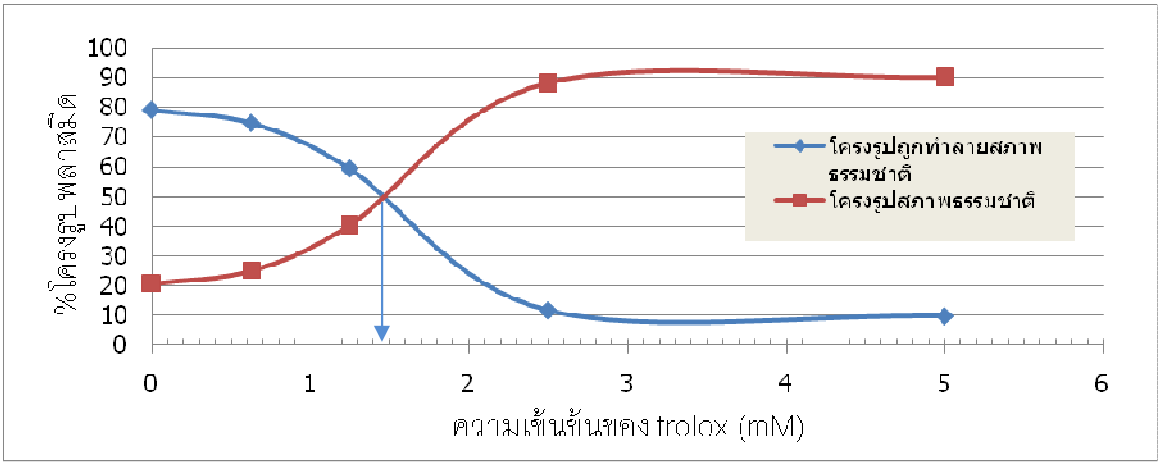
จากการนำ Trolox ที่ความเข้มข้น 0.63 1.25 2.5 และ 5mM ปริมาตร 10 µL เติมลงไปในพลาสมิด pBluescript (II) SK- (25ng/µL) ปริมาตร 5 µL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนที่จะชักนำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอโดย 20 mM AAPH ปริมาตร 10µL ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำไปแยกด้วย agalose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายรูปและวิเคราะห์แถบที่แยกได้ด้วยเครื่อง gel documentation (ภาพประกอบ 21)

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงรูปธรรมชาติแล้วพล็อตกราฟระหว่างปริมาณ Trolox กับร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงรูปสภาพธรรมชาติ จะเรียกปริมาณสารมาตรฐาน Trolox หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ว่า IC_{50} ของการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ (ภาพประกอบ 22)

ผลการวิเคราะห์พบว่า Trolox สามารถป้องกันความเสียหายของพลาสมิด pBluescript จากอนุมูลอิสระ AAPH ได้ โดยมีลักษณะแปรตามปริมาณ Trolox ที่ใช้ จากกราฟ พบว่า Trolox ที่ความเข้มข้น 1.57mM สามารถยั้บยั้งความเสียหายของพลาสมิดได้ 50% ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.57 ± 0.02 mM



ภาพประกอบ 21 ผลของ Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10µL ต่อการป้องกันการทำลายพลาสมิด pBluescript (25ng/µL) ปริมาตร 5 µL ที่ถูกชักนำด้วย 20 mM AAPH ปริมาตร 10 µL ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 ; ควบคุม; Lane 2 : DNA + AAPH ; Lane 3: 0.63 mM Trolox; Lane 4: 1.25 mM trolox; Lane 5: 2.5 mM Trolox; Lane 6: 5 mM Trolox



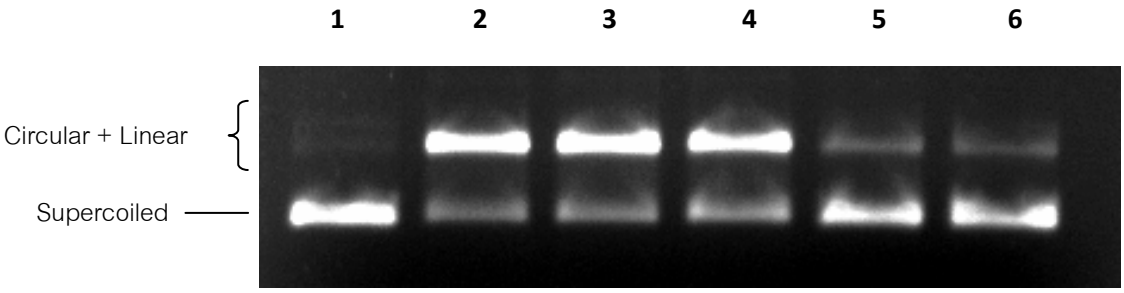
ภาพประกอบ 22 ผลของ Trolox ที่ความเข้มข้น 0 0.63 1.25 2.5 และ 5 mM ต่อร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย 20mM AAPH ปริมาตร 10 µL

4.3 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิด pBluescript จาก AAPH

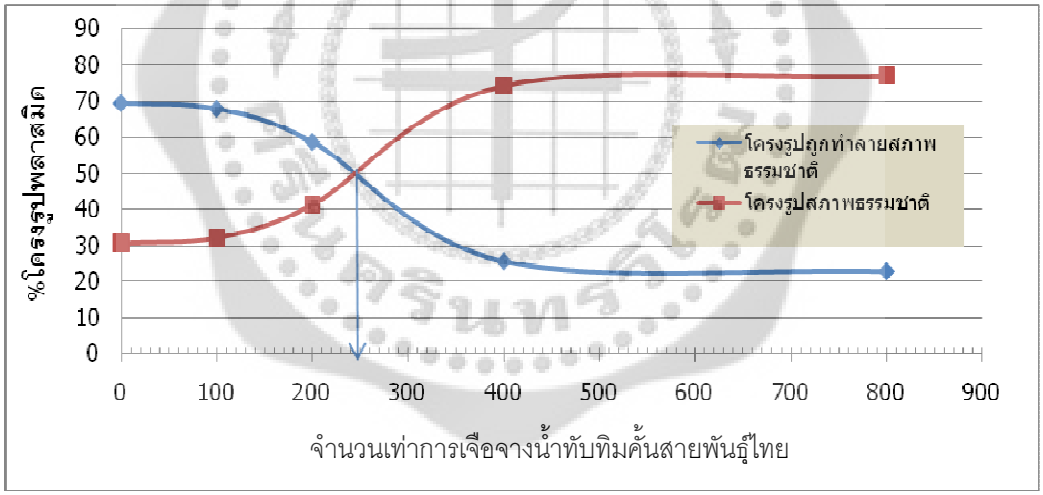
จากการนำน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:100 1:200 1:400 และ 1:800 เท่า ปริมาตร 10 µL เติมลงไปในพลาสมิด pBluescript (25ng/µL) ปริมาตร 5 µL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนที่จะชักนำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอของ โดย 20 mM AAPH ปริมาตร 10µL ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายรูปและวิเคราะห์แถบที่แยกได้ด้วย gel documentation (ภาพประกอบ 23)

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงรูปสภาพธรรมชาติแล้วพล็อตกราฟระหว่างปริมาณน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย กับร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงรูปสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบ 24)

ผลการวิเคราะห์พบว่า น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยสามารถป้องกันความเสียหายของ พลาสมิด pBluescript จากอนุมูลอิสระ AAPH ได้ โดยมีลักษณะแปรตามปริมาณน้ำทับทิมคั้นที่ใช้ จากกราฟพบว่า น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่อัตราส่วนการเจือจาง 243 เท่า สามารถยับยั้งความเสียหายของ พลาสมิดได้ 50% ซึ่งคำนวณเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 41.16 ± 0.45 nL



ภาพประกอบ 23 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย อัตราส่วนการเจือจางต่างๆ ปริมาตร 10 µL ต่อการป้องกันการทำลายพลาสมิด pBluescript (25ng/µL) ปริมาตร 5 µL ที่ถูกชักนำด้วย 20 mM AAPH ปริมาตร 10 µL ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 ; ควบคุม; Lane 2 : DNA + AAPH; Lane 3: น้ำทับทิมเจือจาง1:800; Lane 4 น้ำทับทิมเจือจาง 1: 400; Lane 5 น้ำทับทิมเจือจาง 1: 200; Lane 6 น้ำทับทิมเจือจาง 1: 100



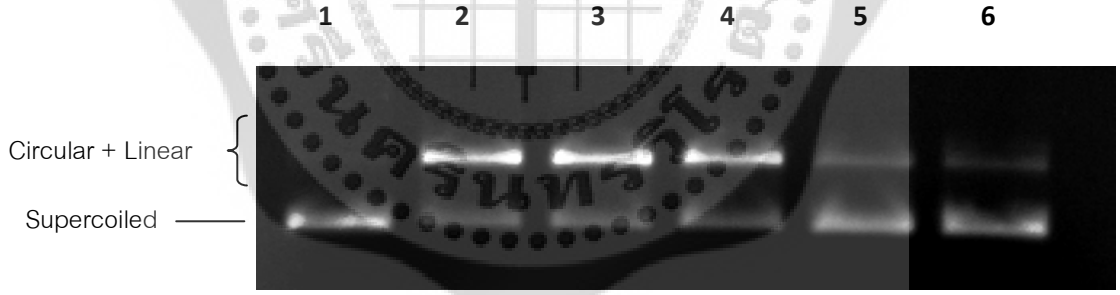
ภาพประกอบ 24 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:100 – 1:800 ต่อ ร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย 20 mM AAPH ปริมาตร 10 µL

4.4 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิด pBluescript จาก AAPH

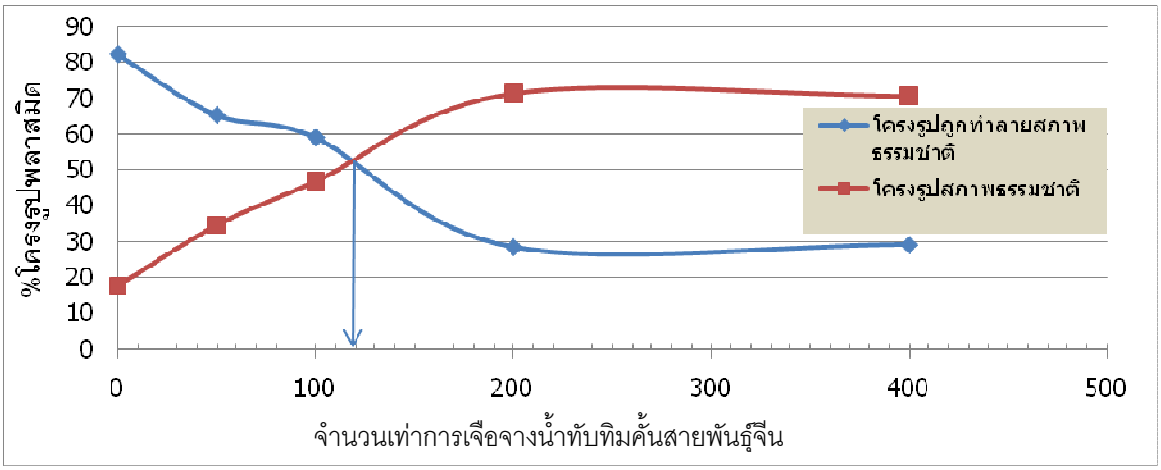
จากการนำน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:50 1:100 1:200 และ 1:400 ปริมาตร 10 µL เติมลงไปในพลาสมิด pBluescript (25ng/µL) ปริมาตร 5 µL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนที่จะชักนำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอของ 20mM AAPH ปริมาตร 10µL ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ไปถ่ายรูปและวิเคราะห์แถบที่แยกได้ด้วย gel documentation (ภาพประกอบ 25)

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงรูปสภาพธรรมชาติแล้วพล็อตกราฟระหว่างปริมาณน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน กับร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลายและโครงรูปสภาพธรรมชาติ (ภาพประกอบ 26)

ผลการวิเคราะห์พบว่า น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนสามารถป้องกันความเสียหายของ พลาสมิด pBluescript จากอนุมูลอิสระ AAPH ได้ โดยมีลักษณะแปรตามปริมาณน้ำทับทิมคั้นที่ใช้ จากกราฟพบว่า น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนที่อัตราส่วนการเจือจาง 120 เท่า สามารถยั้บยั้งความเสียหายของ พลาสมิดได้ 50% ซึ่งคำนวณเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 83.34 ± 0.69 nL



ภาพประกอบ 25. ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนที่อัตราส่วนการเจือจางต่างๆ ปริมาตร 10µL ต่อการป้องกันการความเสียหายพลาสมิด pBluescript (25ng/µL) ปริมาตร 5 µL ที่ถูกชักนำด้วย 20 mM AAPH ปริมาตร 10 µL ที่ 37 °C เป็นเวลา 90 นาที Lane 1 ; ควบคุม; Lane 2 : DNA + AAPH; Lane 3:น้ำทับทิมเจือจาง 1:400; Lane 4:น้ำทับทิมเจือจาง1:200; Lane 5:น้ำทับทิมเจือจาง 1:100; Lane 6:น้ำทับทิมเจือจาง 1: 50



ภาพประกอบ 26 ผลของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนที่อัตราส่วนเจือจาง 1:50 – 1:400 ต่อร้อยละของโครงรูปพลาสมิด pBluescript ที่ถูกชักนำให้เกิดการทำลายสภาพธรรมชาติด้วย 20 mM AAPH ปริมา ตร 10 µL

ความสามารถของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์สายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีนเมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระพบว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยสามารถป้องกันความเสียหายได้ดีกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนประมาณ 2.0 เท่า

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ มุ่งศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระในน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จีน และสายพันธุ์ไทย เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการให้ข้อมูลแก่ผู้บริโภค ที่จะเลือกบริโภคเครื่องดื่มประเภทน้ำผลไม้คั้นสดที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสูงสุด จากรายงานการวิจัยจำนวนมาก พบว่าอนุมูลอิสระเป็นตัวการสำคัญที่ก่อความเสียหายต่อชีวโมเลกุลทั้งหลาย โดยเฉพาะความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (Patra. 2008: 1193-1201., Franco; et al. 2008: 6-11) ที่สามารถนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ (Halliwell. 2002: 531-542) จึงจำเป็นที่ร่างกายต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระอย่างเพียงพอเพื่อป้องกันการทำลายดีเอ็นเอ มีรายงานการพบสารต้านอนุมูลอิสระในพืชพรรณธรรมชาติที่บริโภคซึ่งสามารถป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ เช่น พบในสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นเมืองของอินเดีย (*Mentha spicata*) (Kumar ; & Chattopadhyay. 2007: 1377-1384) พบในน้ำชาชนิดต่างๆ (รัตนา สัมพันธชิต. 2552: 46, Wei; et al. 2006: 90-95) พบในสารสกัดบัวหลวง (มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร; ธัญลักษ์ ภูมิวัฒนะ; และ ภูริชญา สมภาร. 2550: 114-119) ในด้านผลไม้ มีรายงานว่าน้ำทับทิมคั้นสดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และต้าน lipid peroxidation สูงมาก (Cam; Hisil; & Durmaz. 2009: 721-726) ทั้งนี้ สารพฤกษเคมีสำคัญที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ คือสารโพลีฟีนอล กลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีหลายชนิด ชนิดที่พบมากในน้ำทับทิมคือ สารที่ให้สีจำพวกแอนโทไซยานิน (Lansky ; & Newman. 2007: 180-191) และยังพบวิตามินซี ที่ทำให้ผลไม้มีรสเปรี้ยว ซึ่งมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่นเดียวกัน (Maddavi; et al. 2010 : 968-972)

ทับทิมแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (Cam; Hisil; & Durmaz. 2009: 721-726) ในประเทศไทยทับทิมที่นิยมบริโภคเป็นสายพันธุ์ที่นำเข้าจากประเทศจีนในช่วงฤดูฝน (มิถุนายน – พฤศจิกายน) มีขนาดลูกใหญ่ เม็ดเล็กให้ปริมาณน้ำคั้นมาก มีรสชาติหวานกลมกล่อม น่ารับประทานและมีราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับทับทิมที่นำเข้าจากยุโรปและอินเดีย สำหรับทับทิมที่พบในประเทศไทยนั้น นิยมปลูกเพื่อเสริมสิริมงคล เป็นไม้ดอกไม้ประดับ (สมุนไพรไทยทางทันตกรรม. 2550: 124-126) ไม่นิยมปลูกเพื่อบริโภคหรือจำหน่ายเนื่องจากมีขนาดลูกที่เล็กกว่ามีปริมาณน้ำที่คั้นได้น้อย มีเม็ดใหญ่ และมีรสเปรี้ยว แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยเริ่มมีความพยายามที่จะปรับปรุงพัฒนาพันธุ์ทับทิมเพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์มากขึ้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นทั้ง 2 สายพันธุ์

การศึกษาวิจัย ได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH และศึกษาความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอพลาสมิด pBluescript (II) SK- จากอนุมูล AAPH และวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มโพลีฟีนอล เป็นโพลีฟีนอลรวม โดยใช้ Folin-Ciocalteau reagent และวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี โดย HPLC แบบ reversed phase ในน้ำทับทิม 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จีน

ในการศึกษาความสามารถต้านอนุมูล DPPH ได้ใช้ $DPPH^{\bullet}$ ผสมกับน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย สายพันธุ์จีน หรือ สารมาตรฐาน Trolox เมื่อเกิดการต้านอนุมูลอิสระโดยสารตัวอย่าง จะทำให้ปริมาณ DPPH ลดลง (ภาพประกอบ 1 ในภาคผนวก ข) นำไปคำนวณร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) แล้วพล็อตกราฟระหว่าง %inhibition กับปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ จากกราฟหาค่าการยับยั้งที่ ร้อยละ 50 เรียกค่าการยับยั้งนี้ว่า IC_{50} นำค่า IC_{50} ไปเปรียบเทียบกันว่าสายพันธุ์ใดมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าจะมีค่า IC_{50} น้อยกว่า ผลการศึกษาวิจัยพบว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.89 ± 0.02 µL ซึ่งน้อยกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ จีนซึ่งค่าเท่ากับ 2.26 ± 0.03 µL ดั้งนั้นน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสายพันธุ์จีนประมาณ 2.5 เท่าและจากการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteau regent ใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน รายงานเป็นค่า Gallic acid equivalent (GAE) พบว่าค่าที่ได้เป็นไปในทำนองเดียวกับความสามารถต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีปริมาณโพลีฟีนอลรวมสูงกว่าในน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนประมาณ 2.7 เท่า โดยมีค่าเท่ากับ 2.65 ± 0.02 และ 0.97 ± 0.01 µgGAE/µL ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ แคม; ไฮซิล; และเดอมัส (Cam; Hisil; & Durmaz. 2009: 721-726) ซึ่งศึกษาน้ำทับทิม 8 ชนิดปลูกในประเทศตุรกี พบว่าทับทิมแต่ละสายพันธุ์ให้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 2 ชนิด คือ DPPH และ อนุมูล ABTS แตกต่างกัน และมีปริมาณโพลีฟีนอลรวม เป็นไปในทางเดียวกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิดเช่นเดียวกัน

วิตามินซี เป็นสารที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้เหมือนกับสารกลุ่มโพลีฟีนอล (Maddavi; et al. 2010: 968-972) มีรสเปรี้ยว เมื่อรับประทานพบว่าทับทิมสายพันธุ์ไทยมีรสเปรี้ยวส่วนสายพันธุ์จีนมีรสหวาน จากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีโดย วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยซึ่งมีรสเปรี้ยวมีปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 0.122 ± 0.00 µg/µL ส่วนน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนซึ่งมีรสหวานไม่พบปริมาณวิตามินซีแต่อย่างใด แสดงว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน ไม่ได้เกิดจากวิตามินซี แต่เกิดจากสารโพลีฟีนอลเพียงอย่างเดียว อีกทั้งปริมาณโพลีฟีนอลรวมยังน้อยกว่าจึงทำให้น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนสามารถต้านอนุมูลิสระได้น้อยกว่า

จะเห็นได้ว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยซึ่งมีปริมาณโพลีฟีนอลรวม และปริมาณวิตามินซีสูงกว่าสายพันธุ์จีน เป็นผลให้ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH เหนือกว่าสายพันธุ์จีนประมาณ 2.5 เท่า สอดคล้องกับงานวิจัยของมัสดาวีและคณะ (Maddavi; et al. 2010: 968-972) ซึ่งเปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอลรวมและปริมาณวิตามินซีในน้ำผลไม้สด และในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ 11 ชนิดในประเทศอิหร่าน พบว่าในบรรดาสารตัวอย่างทั้งหมด น้ำทับทิมสดมีปริมาณโพลีฟีนอลรวมสูงที่สุด และมีปริมาณวิตามินซีสูงด้วย

ในการศึกษาความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนมูลอิสระ ได้ใช้อนุมูลอิสระ AAPH ทำให้เกิดความเสียหายแก่พลาสมิด pBluescript (II) SK- ซึ่งเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยปกติพลาสมิดมีโครงรูป supercoiled เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ AAPH จะทำให้สายดีเอ็นเอ 1 สายเกิดรอยแหว่ง (nick) ขึ้นจึงคลายเกลียวออกเป็นรูป open circular และต่อมาเมื่อทำปฏิกิริยาต่อจนเกิดรอยแหว่งขึ้นบนอีกสายหนึ่งรวมเป็น 2 สายจะทำให้มีโครงรูปเป็น linear ตามลำดับ (Kaur ; et al. 2008:1377-1384) ซึ่งตรวจวัด ได้โดยการตรวจการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอทั้ง 3 โครงรูปด้วย agarose gel electrophoresis โดยดีเอ็นเอ supercoiled จะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าโครงรูป linear และ open circular ตามลำดับ เมื่อนำมาส่องด้วย UV-Transmitter จะเห็นเป็น 3 แถบในแผ่นเจล เรียงตามลำดับการเคลื่อนที่ ดังนี้ โครงรูป supercoiled >โครงรูป linear >โครงรูป open circular (Kumar ; & Chattopadhyay. 2007: 1377-1384) จึงพิจารณาความเสียหายของดีเอ็นเอจากโครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ ซึ่งก็คือผลรวมของโครงรูป open circular และ โครงรูป linear เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ด้วยจะทำให้เกิดการยับยั้ง เป็นผลให้โครงรูปธรรมชาติมีปริมาณสูงและโครงรูปที่ถูกทำลายสภาพมีปริมาณลดลง การรายงานการยับยั้งความเสียหาย ทำโดยคำนวณหาร้อยละโครงรูปธรรมชาติและโครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ นำไปพล็อตกราฟกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระตัวอย่าง คือ น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน หรือ Trolox จากกราฟอ่านค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ดีเอ็นเออยู่ในโครงรูปธรรมชาติ และโครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติร้อยละ 50 เรียกค่านี้ว่า IC_{50} เพื่อใช้เปรียบเทียบความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอในน้ำทับทิมคั้นทั้ง 2 สายพันธุ์

การวิจัย เริ่มจากการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AAPH ที่สามารถสร้างความเสียหายให้แก่ พลาสมิด pBluescript (II) SK- พบว่าความเสียหายของพลาสมิดมีลักษณะแปรตามปริมาณ AAPH ที่ใช้ ซึ่งพบว่า AAPH ที่ความเข้มข้น 20 mM สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของพลาสมิดได้เกือบทั้งหมด ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ AAPH ที่ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 10 µl เป็นปริมาณอนุมูลอิสระที่ใช้ตลอดการวิจัย ต่อมาจึงศึกษาความสามารถของน้ำทับทิมคั้น 2 สายพันธุ์ ต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิด pBluescript (II) SK- โดยผสม pBluescript (II) SK- กับน้ำทับทิมคั้นสาย

พันธุ์ไทย น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน หรือสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox เป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วเติมอนุมูลอิสระ AAPH ลงไปเพื่อให้เกิดการทำลายพลาสมิด สารตัวอย่างที่ใช้หากมีความสามารถในการต้านอนุมูล AAPH จะทำให้ความเสียหายของดีเอ็นเอลดลง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ โดยการทำ agarose gel electrophoresis คำนวณหาปริมาณโครงรูปธรรมชาติ โครงรูปที่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ จากการวิจัยได้ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 20 V (ซึ่งต่างจากที่ใช้ในการวิจัยของคูมาร์และชัดโตพัดติเยที่ใช้ที่ 50 V) ซึ่งเป็นกระแสไฟที่น้อยไปทำให้เห็นเป็น 2 แถบโดยแถบที่ไกลที่สุดคือโครงรูปธรรมชาติ supercoiled และอีกแถบหนึ่งเป็นโครงรูปที่ถูกทำลาย 2 โครงรูป คือ linear และ open circular ซึ่งแยกจากกันไม่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามไม่มีผลต่อการคำนวณร้อยละโครงรูปที่ถูกทำลาย เนื่องจากเป็นผลรวมของ linear และ open circular ดังนั้นจึงยังคงสามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้ ผลการวิจัยพบว่าน้ำทับทิมทั้ง 2 สายพันธุ์ รวมทั้ง Trolox แสดงความสามารถในการป้องกันความเสียหายของพลาสมิดได้ในลักษณะแปรตามปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ และพบว่า IC_{50} ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีค่า 41.16 ± 0.45 nL ซึ่งน้อยกว่าของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนซึ่งมีค่า 83.34 ± 0.69 nL แสดงว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีความสามารถยับยั้งความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนประมาณ 2.0 เท่า สอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ปริมาณโพลีฟีนอลและวิตามินซีที่พบ

เมื่อพิจารณาภาพรวมของปริมาณและความสามารถสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ตามตาราง 9 พบว่าสอดคล้องกันทั้งหมด กล่าวคือน้ำทับทิมไทยมีปริมาณโพลีฟีนอลรวม และปริมาณวิตามินซีสูงกว่าน้ำทับทิมจีน จึงแสดงความสามารถได้ดีกว่าทั้งในด้านการต้านอนมูลอิสระ DPPH และการยับยั้งความเสียหายของดีเอ็นเอจาก AAPH ประมาณ 2.5 เท่า และ 2.0 เท่าตามลำดับ

ตาราง 9 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50}) ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวม ปริมาณวิตามินซี และความสามารถในการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด (IC_{50}) ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย

น้ำทับทิมคั้น	IC_{50} ต่อการยับยั้ง DPPH (µL)	ปริมาณโพลีฟีนอลรวม (µgGAE/µL)	ปริมาณวิตามินซี (µg/µL)	IC_{50} ต่อการป้องกันการเสียหายของพลาสมิด (nL)
สายพันธุ์ไทย	0.89 ± 0.02	2.65 ± 0.01	0.122 ± 0.00	41.16 ± 0.45
สายพันธุ์จีน	2.26 ± 0.03	0.97 ± 0.01	ND	83.34 ± 0.69

ND = ไม่พบ

และจากตาราง 9 จะพบว่า ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งอนุมูล DPPH และ AAPH จะขึ้นอยู่กับปริมาณสารกลุ่มโพลีฟีนอลรวมเป็นหลัก คือเมื่อมีปริมาณสารกลุ่มโพลีฟีนอลมากจะสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่า กลุ่มที่มีปริมาณโพลีฟีนอลน้อย

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำคั้นที่ได้จากทับทิมทั้ง 2 สายพันธุ์ จะพบว่ามีปริมาณที่แตกต่างกันมาก โดยน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนจะให้ปริมาณน้ำคั้นมากกว่าสายพันธุ์ไทยประมาณ 2.2 เท่า (เฉลี่ย128 มิลลิลิตร และ 64 มิลลิลิตรต่อลูก ตามลำดับ) ซึ่งเปรียบเทียบเชิงปริมาณจะพบว่า น้ำคั้นทับทิมที่ได้จากสายพันธุ์จีน 1 ลูกจะเท่ากับน้ำคั้นทับทิมที่ได้จากสายพันธุ์ไทย 2 ลูก ซึ่งจากการวิจัยจะพบว่าค่า IC_{50} ต่อการยับยั้งและป้องกันอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิด ของทับทิมสายพันธุ์ไทยมีค่าประมาณ 2.0 – 2.5 เท่า ของทับทิมสายพันธุ์จีน เมื่อนำมาเปรียบเทียบเชิงปริมาณ จะพบว่าการบริโภคทับทิมทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่มีขนาดใกล้เคียงกันจะให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

จากผลการวิจัยจึงสรุปว่า

1. **ในเชิงคุณภาพ** น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้สูงกว่าน้ำทับทิมคั้นจีนอย่างมีนัยสำคัญ

2. **ในเชิงปริมาณ** น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนมีปริมาณน้ำทับทิมคั้นมากกว่าน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย และเมื่อเปรียบเทียบต่อลูกโดยประมาณจะพบว่า น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย 2 ลูก จะเท่ากับน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน 1 ลูก

ดังนั้น การเลือกบริโภคน้ำทับทิมคั้นทั้งสองสายพันธุ์ จะให้คุณประโยชน์ต่อร่างกายไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อรับประทานในเชิงปริมาณต่อหน่วย (ต่อ1ลูกทับทิม)

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ใช้เฉพาะส่วนของน้ำทับทิมคั้นเท่านั้น ไม่ได้ศึกษาในส่วนต่างๆ ของผลทับทิม ในการศึกษาครั้งถัดไปควรศึกษาส่วนอื่นๆด้วย เช่น เปลือกและเมล็ด

2. วิธีทดสอบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งวิธี DPPH assay การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลรวม การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี และ วิธี gel electrophoresis สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับพืชพรรณธรรมชาติชนิดอื่นๆได้

3. สายพันธุ์ทับทิมแต่ละสายพันธุ์จะให้ผลผลิตและปริมาณสารสำคัญต่างกัน ดังนั้นการเลือกบริโภคจึงควรลือกสายพันธุ์ให้คุณค่าต่อสุขภาพสูง

4. กระแสไฟฟ้าที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis น้อยเกินไป จึงทำให้โครงรูปพลาสมิด open circular และ linear ไม่แยกจากกัน ในการศึกษาครั้งถัดไปควรใช้กระแสไฟที่ 50 V

บรรณานุกรรม

บรรณานุกรม

จารุวรรณ สุ่มมาตย์. (2541). *องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกทับทิมต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล.

ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่. (2551). *กิจกรรมต้านออกซิเดชันของสาหร่ายเต่า*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา) เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

นฐพล ตั้งสุภูมิ. (2552). *รู้จักน้ำทับทิม*. สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2552, จาก http://www.inmu.mahidol.ac.th/th/knowledge/pdf/239.pdf

ไบร์ท-ไบโอติค. (2554). *เอนไซม์ ผู้กำจัดอนุมูลอิสระ*. สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2554, จาก http://www.bright-biotic.com/enzyme_anti_oxidation.html

ปิยะนันท์ เส็งประชา. (2547). *การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านการออกซิเดชันของผักปลัง*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

ปิยาภัทร ไตรสนธิ. (2550). *ผลของความสูงพื้นที่และสายพันธุ์ต่อกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของตะไคร้ต้น*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. เกษตรศาสตร์ (พืชสวน) เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

พนิดา กุลประสูติดิลก. (2548). *วิธีต้านอนุมูลอิสระในตัวคุณ*. กรุงเทพฯ: สุขภาพใจ.

พัชรินทร์ หัตถมาตร. (2552). *ทับทิม....ผลไม้มหัศจรรย์*. สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2552, จาก http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/os_1_2550_tuptim.pdf

มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร; ธัญลักษณ์ ภูมิวัฒนะ; และ ภูริชญา สมภาร. (2550, กรกฎาคม-ธันวาคม). ผลการยับยั้งของสารสกัดใบบัวหลวงต่อความเสียหายของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกเหนี่ยวนำโดยอนุมูลอิสระ. *วารสารสาธารสุขมหาวิทยาลัยบูรพา*. 2(2): 114-119.

ไมตรี สุทธจิตต์. (2554). *Generation of free radical, oxidative stress and their damaging properties*. สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2554, จาก http://home.kku.ac.th/mdconf/km/antiox.pdf

ยุพา สุชนชาติ. (2541). *การวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กในน้ำด้วยเปลือกของผลทับทิม*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาธารณสุขศาสตร์ (อนามัยสิ่งแวดล้อม) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.

ยูถิกา สร้อยระย้า. (2550). *ผลของกระบวนการผลิตต่อปริมาณคาเทชินและโพลีฟีนอลในชาอู่หลง.* การค้นคว้าแบบอิสระ วท.ม. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

รัชนี ตัณฑะนิชกุล. (2547). *เคมีอาหาร.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

รัตนา สัมพันธชิต. (2552). *ความสามารถของสารสกัดใบชา 3 ชนิดต่อการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ.* รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วราดุล ฉัตรทอง. (2552). *การหาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในน้ำผลไม้โดยโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง.* รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สมทรง เลขะกุล. (2542). *ชีวเคมีของวิตามิน.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ศุภวนิชการพิมพ์.

สมุนไพรไทยทางทันตกรรม. (2550). กรุงเทพฯ: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุพร นุชดำรงค์. (2549). อนุมูลอิสระ: คุณและโทษต่อมนุษย์. *วารสารวิทยาศาสตร์.* มข. 34(2): 97-102.

อัญชนา เจนวิถีสุข. (2544). *การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

โอภา วัชระคุปต์; และคนอื่นๆ. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พริ้นท์.

Aboul-enein, Hassan Y. (1990). Analysis of L- and D-ascorbic acid in fruits and "fruitdrinks by HPLC. *SemFood Ana.* 4(1) : 31-37.

Black, H.S. (2004). Mechanisms of pro- and antioxidation. *American Society for Nutritional Science.* 134 : 3169-3170.

Balasundran, Nagendran; Sundram, Kalyana; & Samman, Samir. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99 : 191-203.

Brand-William, W; M.E, Cuvelier; & C, Berset. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology.* 28: 25-30.

Borochov-Neori, Hamutal; et al. (2009). Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate *(Punica granatum L.)* fruit. *J. Food Compos. Anal.* 22 : 189-195.

Bulteau, Anne-Laure; Szweda, Luke I.; & Friguet, Bertrand. (2006). Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Experimental Gerontology*. 41 : 653–657.

Cam, Mustafa; Hisil, Hisil; & Durmaz, Gokhan. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem.* 112 : 668–673.

Campanella, L.; M. Battilotti; & R. Lecce. (2007). Protective action of antioxidants against aminoacids degradation caused by free radicals. *International journal of environment and health*. 1(1) : 98-119.

Castaneda-Ovando, Araceli; et al. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*. 113 : 859-871.

Chatgilialoglu, Chryssostomos; & Neill, Peter O. (2001). Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology*. 36 : 1459-1471.

Chia; et al. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64 : 923-933.

Chonlayut Raweewan. (2006). *Determination of vitamins in fruits of Morinda citrifolia Linn. and Phyllanthus Emblica Linn. and their fermented juices.* Thesis, M.S. (Pharmaceutical sciences) Chiang Mai: Graduate School Chiang Mai University. Photocopied.

Combs, Gerald F. (1998). *The vitamins Fundamental aspects in nutrition and health*. Academic Press. : UK.

Cooke, M.S.; et al. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 1195-1214.

Franco, R.; et al. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*. 266 : 6-11.

Gonzalez-Molina, Elena; Moreno, Diego A.; & Garcia-Viguera, Cristina. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chem.* 115 : 1364-1372.

Guo, Changjiang; et al. (2008). Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr. Res*. 28 : 72- 77.

Halliwell, Barry. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biol. Med.* 46: 531-542.

Hanif, Sarmad; et al. (2008). The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA. *Toxicology*. 249 : 19-25.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96: 67-202.

Huang R.; et al. (2007). *Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. Scientia hortriculturae*. 113 :166-172.

Jaiswal, Vidhan; DerMarderosian, Ara; & Porter, John R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (Punica granatum L.). *Food Chem*. 118 : 11–16.

Kasprzak, Kazimierz S. (2002). Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med*. 32(10) : 958–967

Knight, Joseph A. (1999). *Free radicals, Antioxidants, Aging, & disease*. Washington, D.C. : AACC.

Kumar, Akhilesh; & Chattopadhyay, Sharmila. (2007). DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chem*. 100 : 1377-1384.

Kulkarni, Anand P; Aradhya, Somaradhya Mallikarjuna; & Divakar, Soundar. (2004). Isolation and Identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chem*. 87 : 551-557.

Lakhanpal; & Kumar Rai. (2007). QUERCETIN: A VERSATILE FLAVONOID. *IJMU*. 2(2). Retrieved January 04, 2007, from http://www.akspublication.com/paper05jul-dec2007.html

Lako, Jimaima; et al. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant Properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem*. 101 : 1727-1741.

Lansky, Ephraim P; & Newmana, Robert A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* 109 : 177-206.

Mahdavi, Reza; et al. (2010). Determination and Comparison of Total Polyphenol and Vitamin C Contents of Natural Fresh and Commercial Fruit Juices. *Pakistan journal of Nutrition.* 9(10) : 968-972.

Manikandan, S.; et al. (2006). Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* 399 : 17-22.

Milowska, K.;& T, Gabryelak. (2007). Reactive oxygen species and DNA damage after ultrasound exposure. *Biomol. Eng.* 24 : 263-267.

Molyneux, Philip. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2) : 211-219.

Mousavinejad, Gelareh; et al. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chem.* 115 : 1274-1278.

Mruk, Dolores D.; et al. (2002) . Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation In the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 65 : 305–311.

Naz, S.; et al. (2007). Antibacterial Activity Directed Isolation of Compounds from *Punica granatum*. *J. FOOD SCI.* 72(9) : 341-345.

Negi, P.S.;Jayaprakasha, G.K.; & Jena, B.S.. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of Isolation pomegranate peel extracts. *Food Chem.* 80 : 393-397.

Nordberg, Jonas; & Arner, Elias S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol. Med.* 31 : 1287-1312.

Pazmino-Duran, A. E.; et al. (2001). Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants. *Food Chem.* 75(2): 211–216.

Patra, S.K. (2008). Ras regulation of DNA –methylation and cancer. *Experimental Cell Research.* 314: 1193 – 1201.

Poyrazoglu, Ender; Gokmen, Vural; & Artik Nevzat. (2002). Organic acid and Phenolic Compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Grown in Turky. *J. Food Compos. Anal.* 15 : 567-575.

Randhir, R.; Lin, Y.T.; & Shetty, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 13 : 295-307.

Ratnam, D. Venkat. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Controlled Release*. 113: 189-207.

Ricci, D.; et al. (2006). Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia.* 77 : 310-312.

Rout, S; & Banerjee, R. (2007). Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase Inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind fron *Punica granatum*. *Bioresour. Technol*. 98 : 3159-3163.

Sanchez; et al. (2011). *Alpha lipoic acid Protects Brain Cells–Antioxidant Mechanisms For Alzheimer's Prevention. The* Alzheimer *solution*. Retrieved January 11, 2009, from http://www.thealzheimerssolution.com/alpha-lipoic-protects-brain-cells-neurons-antioxidant-mechanisms-for-alzheimers-prevention/

science-projects (2011). *F-Plasmid*. Retrieved January 11, 2012, from http://www.science-projects.com/F-plasmid.html

Schubert, Shay Yehoshua; Lansky, Ephraim Philip; & Neeman, Ishak. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J. Ethnopharmacol*. 66 : 11–17.

Singleton; et al. (1999). *Analysis of total phenolics means of Folin-ciocalteu reagent*. In Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants, Part A. Part A, Packer, Lester. pp. 152-178. San Diego: Academic press.

Sorg, Olivier. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *C. R. Biologies*. 327 : 649–662.

Syed, Deeba N.; Afaq, Farrukh; & Mukhtar Hasan. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Seminars in Cancer Biology*. 17 : 377–385.

Tezcan, Filiz; et al. (2009): Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem*. 115 : 873-877.

Valko, Marian; et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *IJBCB*. 39 : 44–84.

Wei, Qing-Yi; et al. (2006). Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. *Food Chem*. 96 : 90-95.

Xenbase. (2011). pBluescript II SK+/-. Retrieved January 11, 2012, from http://www.xenbase.org/other/static/methods/vector-files/pBSSKplus.jsp

Zhang, P.; & Omaye, S.T. (2001). DNA strand breaking and oxygen tension: effects of β-carotene, α-tocopherol and ascorbic acid. *Food Chem. Toxicol.* 39 : 231-234.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

1. **ค่าเฉลี่ย** (Mean ; $\overline{X}$) คำนวณได้จากสูตร

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_i}{N}$$

เมื่อ X_i คือ ค่าที่ได้จากการทดลองในแต่ละครั้ง

N คือ จำนวณครั้งที่ทำการทดลอง

2. **ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน** (Standard deviation ; SD) คำนวณได้จากสูตร

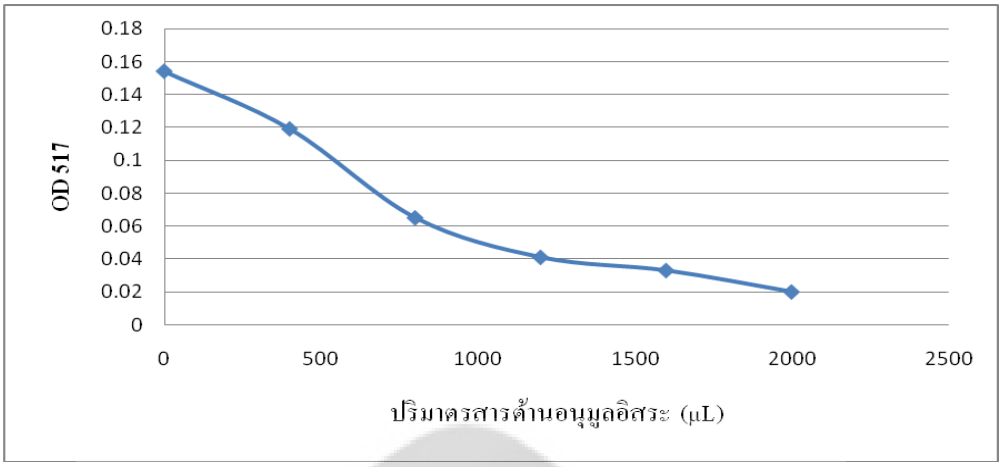
$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \overline{X})^2}{N - 1}}$$

3. ใช้ Independent t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของชุดข้อมูล

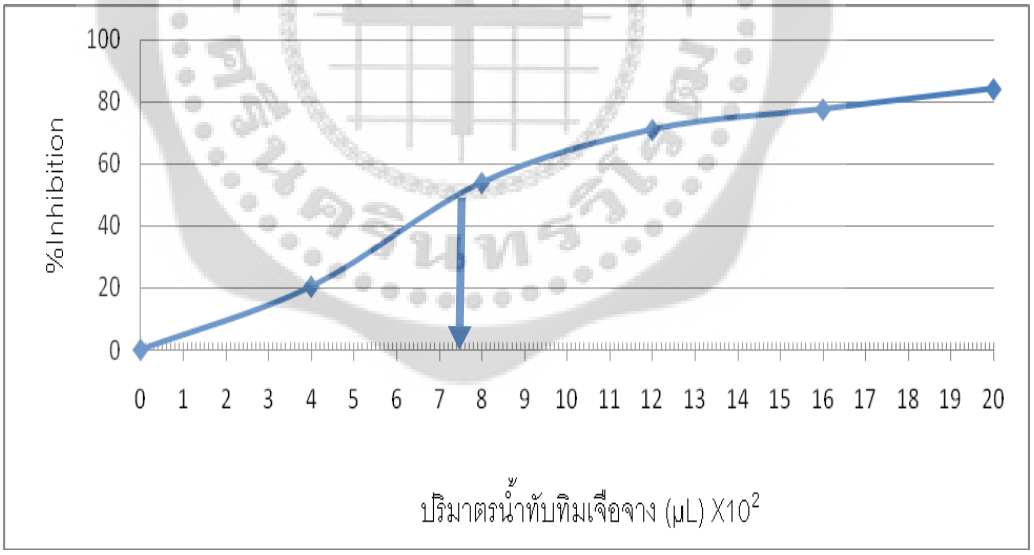
ภาคผนวก ข

ภาพประกอบและตารางวิเคราะห์ข้อมูลวิจัย

1. การวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของน้ำทับทิมคั้น

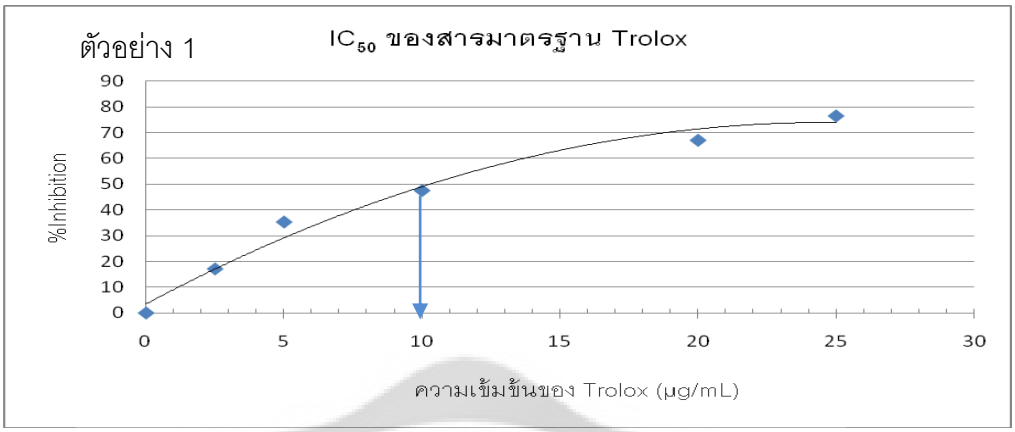


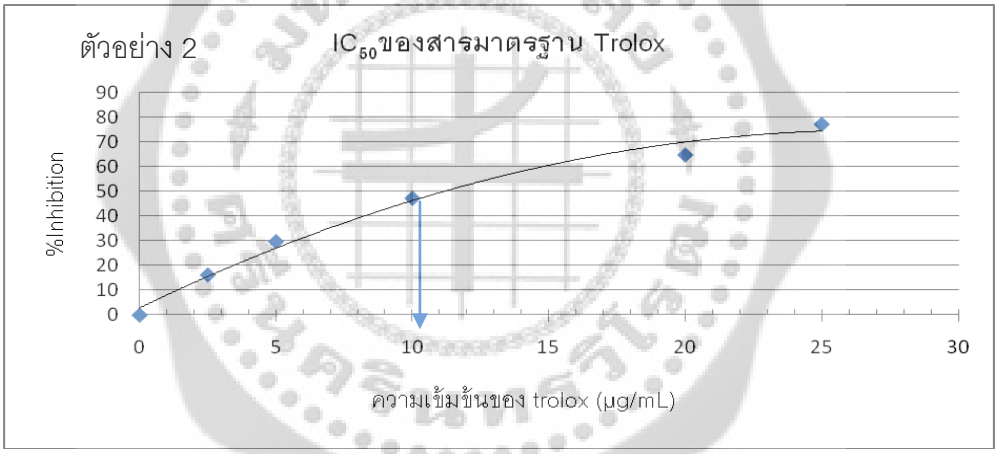
ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงการลดลงของ DPPH radical โดยสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป

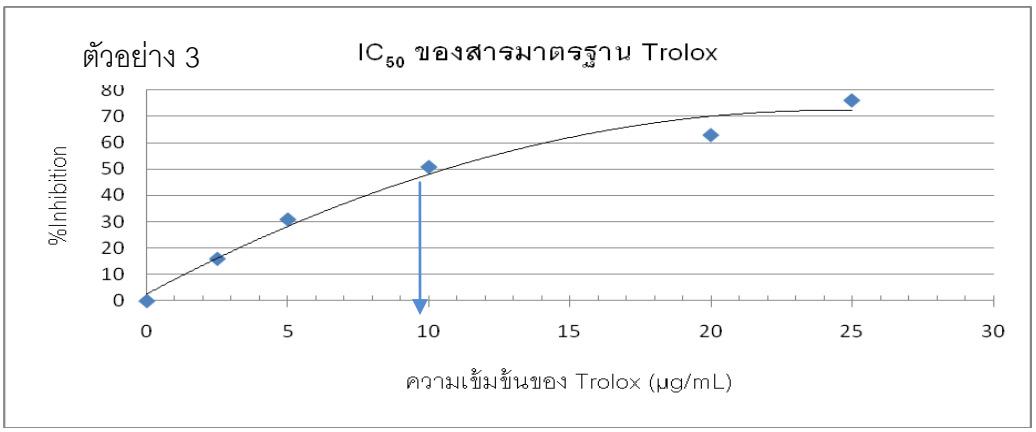


ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงการหาค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป

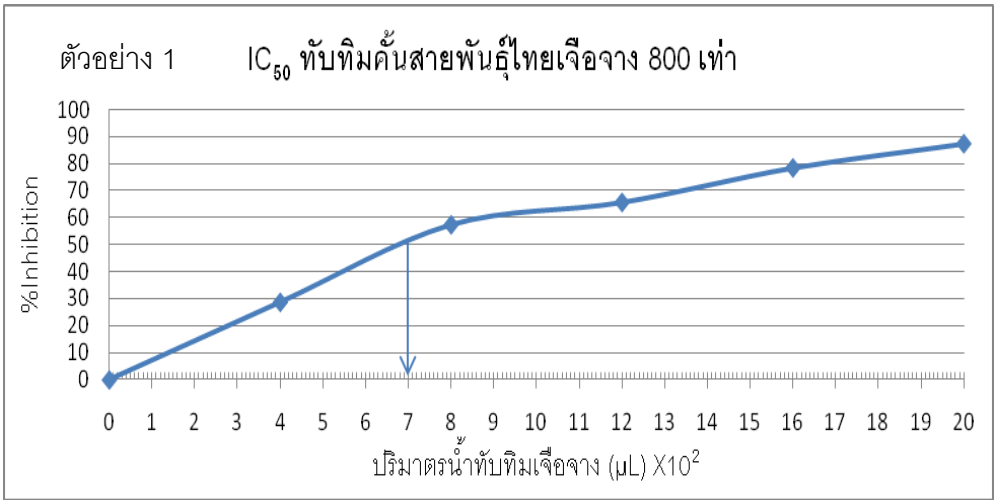
2. การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox และน้ำทับทิมคั้น

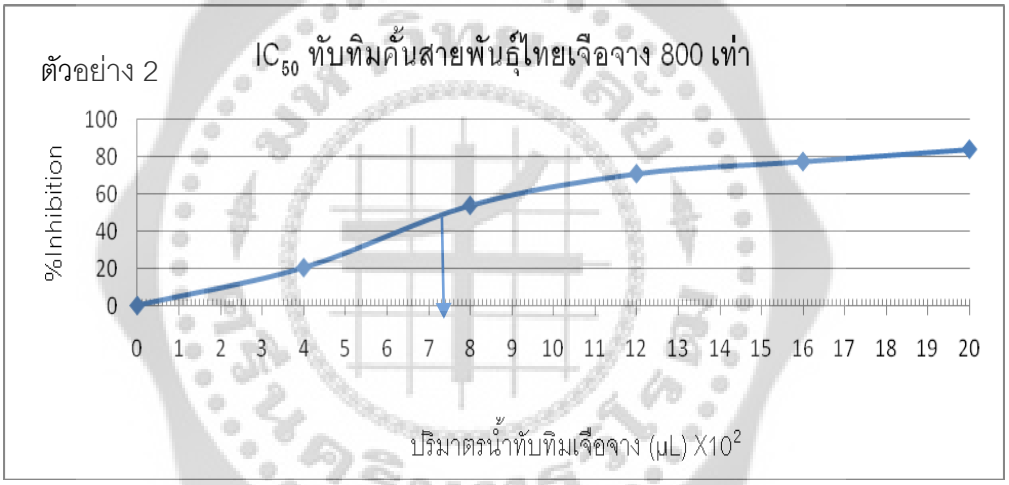


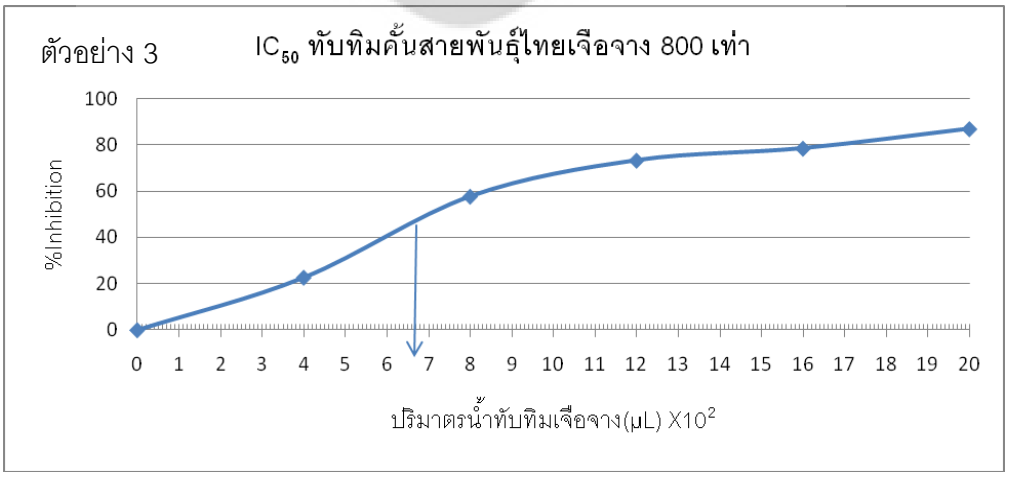




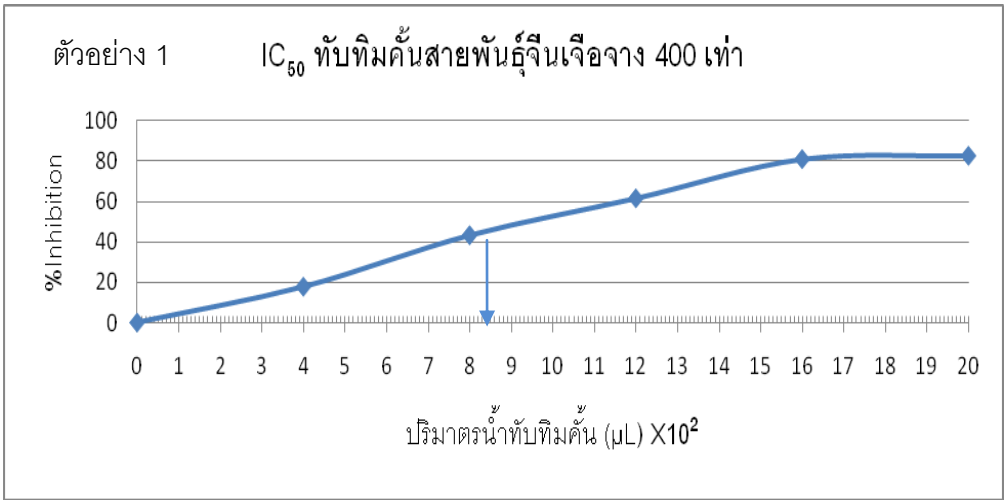
ภาพประกอบ 29 ก. การหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox

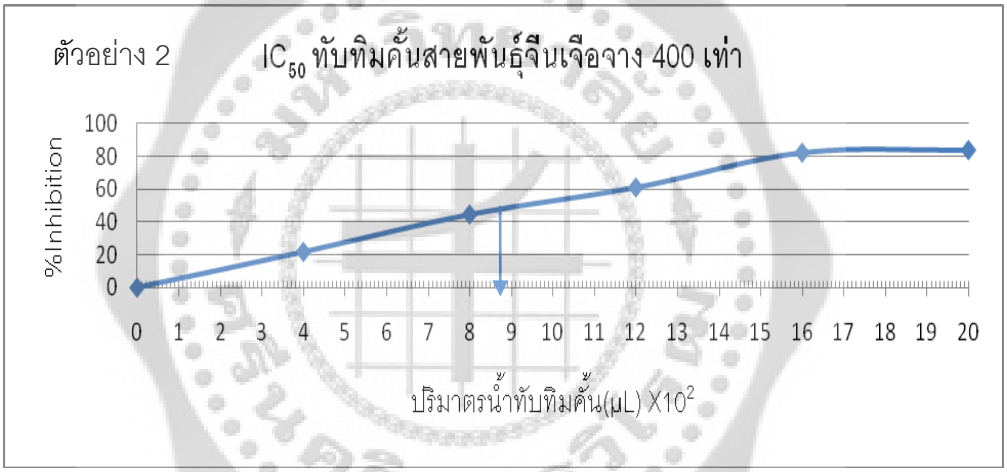


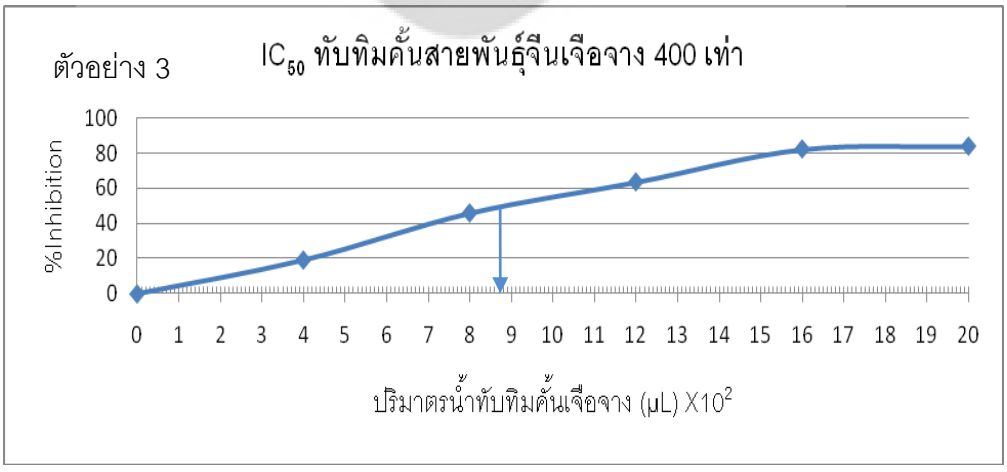




ภาพประกอบ 29 ข. การหาค่า IC_{50} ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย

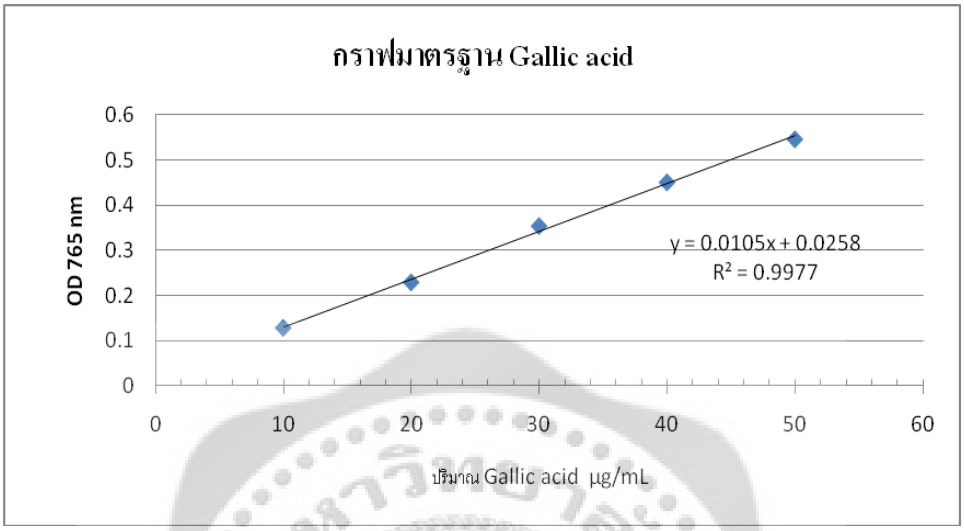






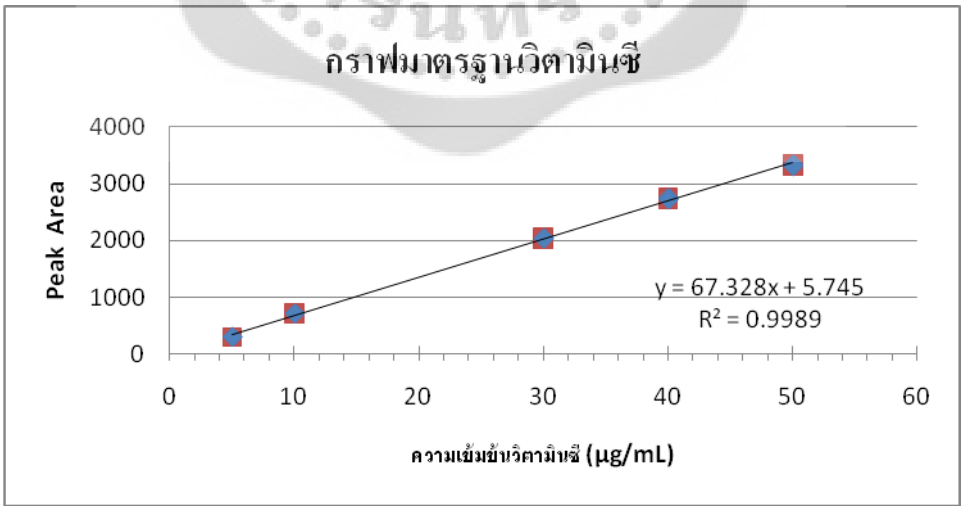
ภาพประกอบ 29 ค. การหาค่า IC_{50} ของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมเป็น µgGAE/mL



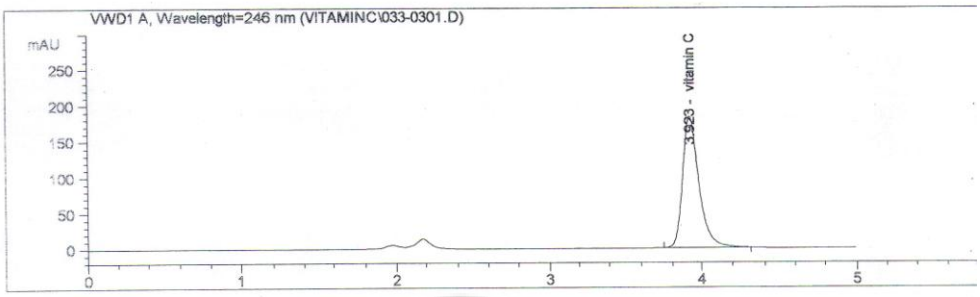
ภาพประกอบ 30. กราฟมาตรฐาน Gallic acid

4. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำทับทิมคั้น โดยเทคนิคโครงมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



ภาพประกอบ 31. กราฟมาตรฐานวิตามินซี

5. โครมาโทแกรมของวิตามินซี สารมาตรฐานและพารามิเตอร์ต่างๆที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC



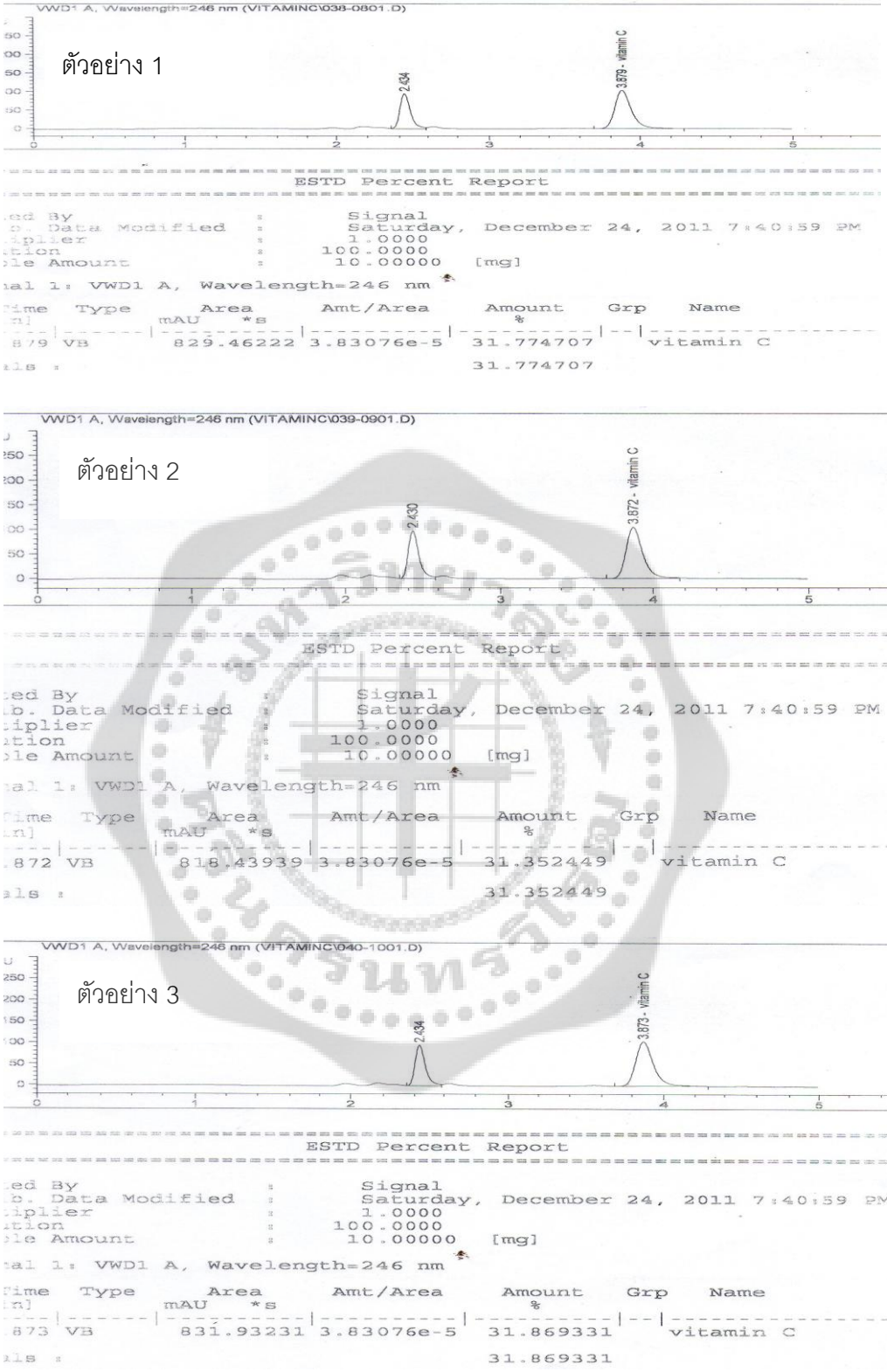
ESTD Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Saturday, December 24, 2011 7:40:59 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 50.0000
Sample Amount : 20.00000 [mg]

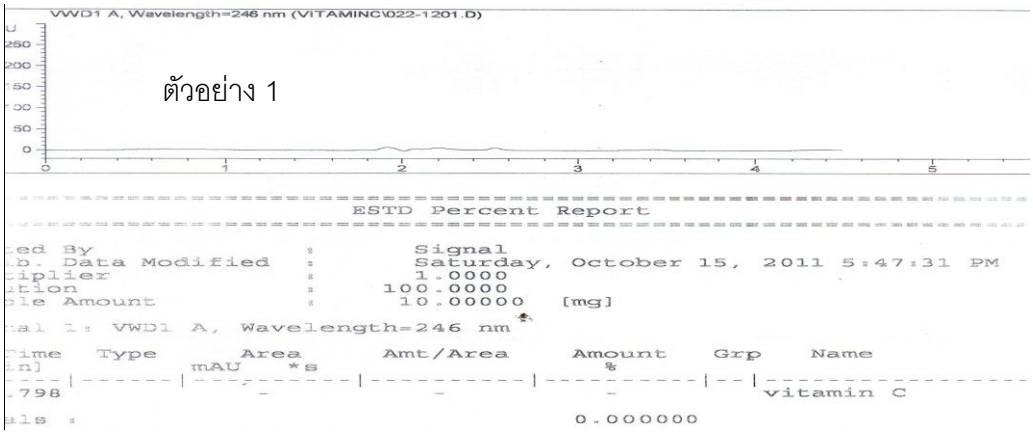
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=246 nm

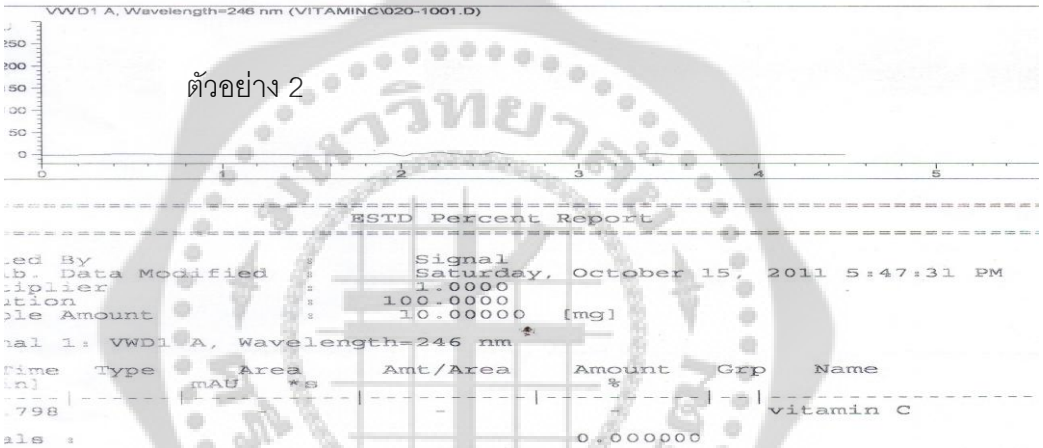
RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount %	Grp	Name
3.923	BB	1452.91650	3.83076e-5	13.914436		vitamin C
Totals :				13.914436		

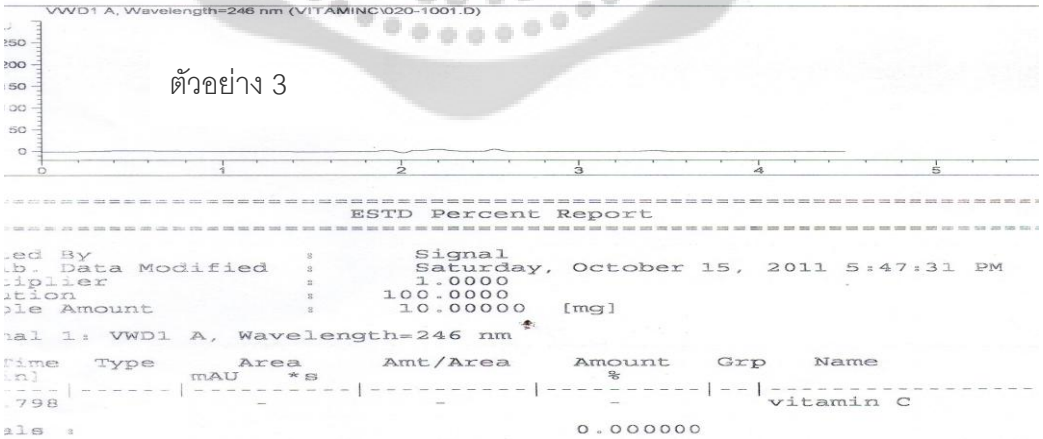
ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินซีและพารามิเตอร์ต่างๆที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC



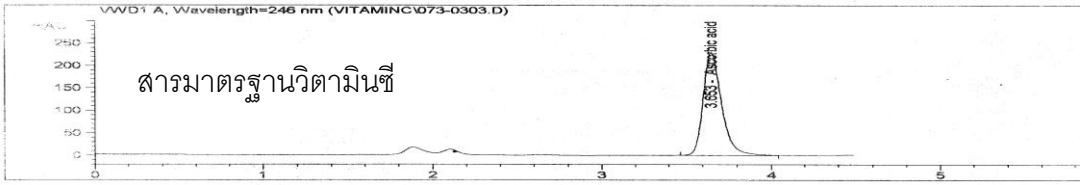
ภาพประกอบ 33 โครมาโทแกรมน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยและพารามิเตอร์ต่างๆที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC







ภาพประกอบ 34 โครมาโทแกรมน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนและพารามิเตอร์ต่างๆที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC

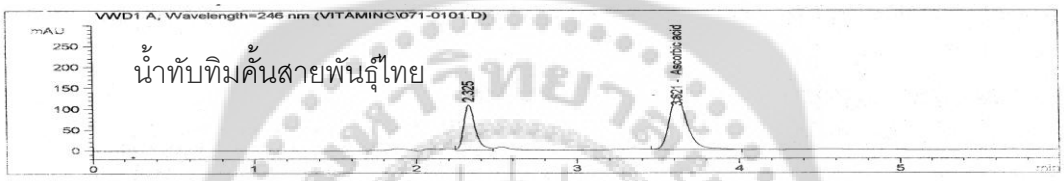


ESTD Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Saturday, March 03, 2012 1:00:10 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 100.0000
Sample Amount : 10.00000 [mg]

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=246 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU*s	Amt/Area	Amount %	Grp	Name
3.653	BB	1713.97900	5.40474e-5	92.636179		Ascorbic acid
Totals :				92.636179		

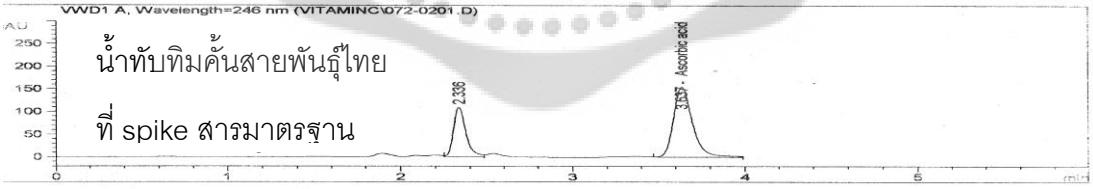


ESTD Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Saturday, March 03, 2012 1:00:10 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 100.0000
Sample Amount : 10.00000 [mg]

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=246 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU*s	Amt/Area	Amount %	Grp	Name
3.621	VB	997.68152	5.40474e-5	53.922133		Ascorbic acid
Totals :				53.922133		



ESTD Percent Report

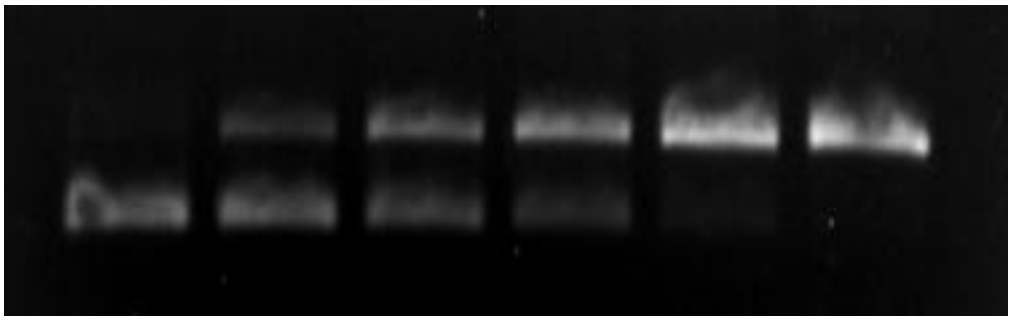
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Saturday, March 03, 2012 1:00:10 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 100.0000
Sample Amount : 10.00000 [mg]

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=246 nm

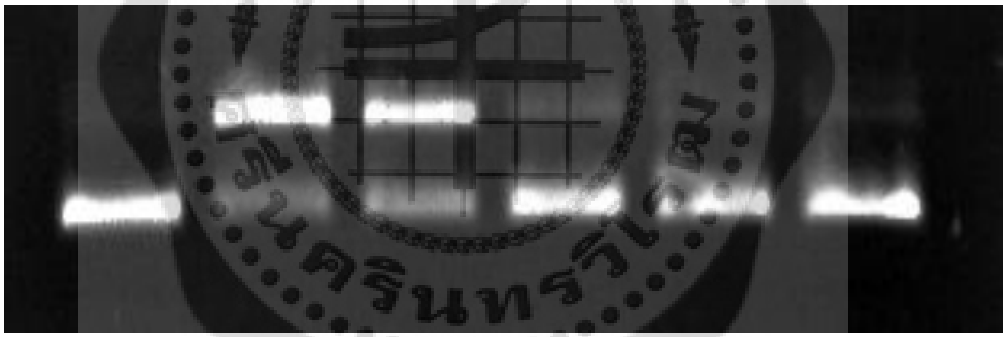
RetTime [min]	Type	Area mAU*s	Amt/Area	Amount %	Grp	Name
3.637	VBA	1196.76489	5.40474e-5	64.682080		Ascorbic acid
Totals :				64.682080		

ภาพประกอบ 35. โครมาโทรแกรมของน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทยที่ spike สารมาตรฐานวิตามินซี และไม่ spike ที่วิเคราะห์ได้จาก software ของ HPLC

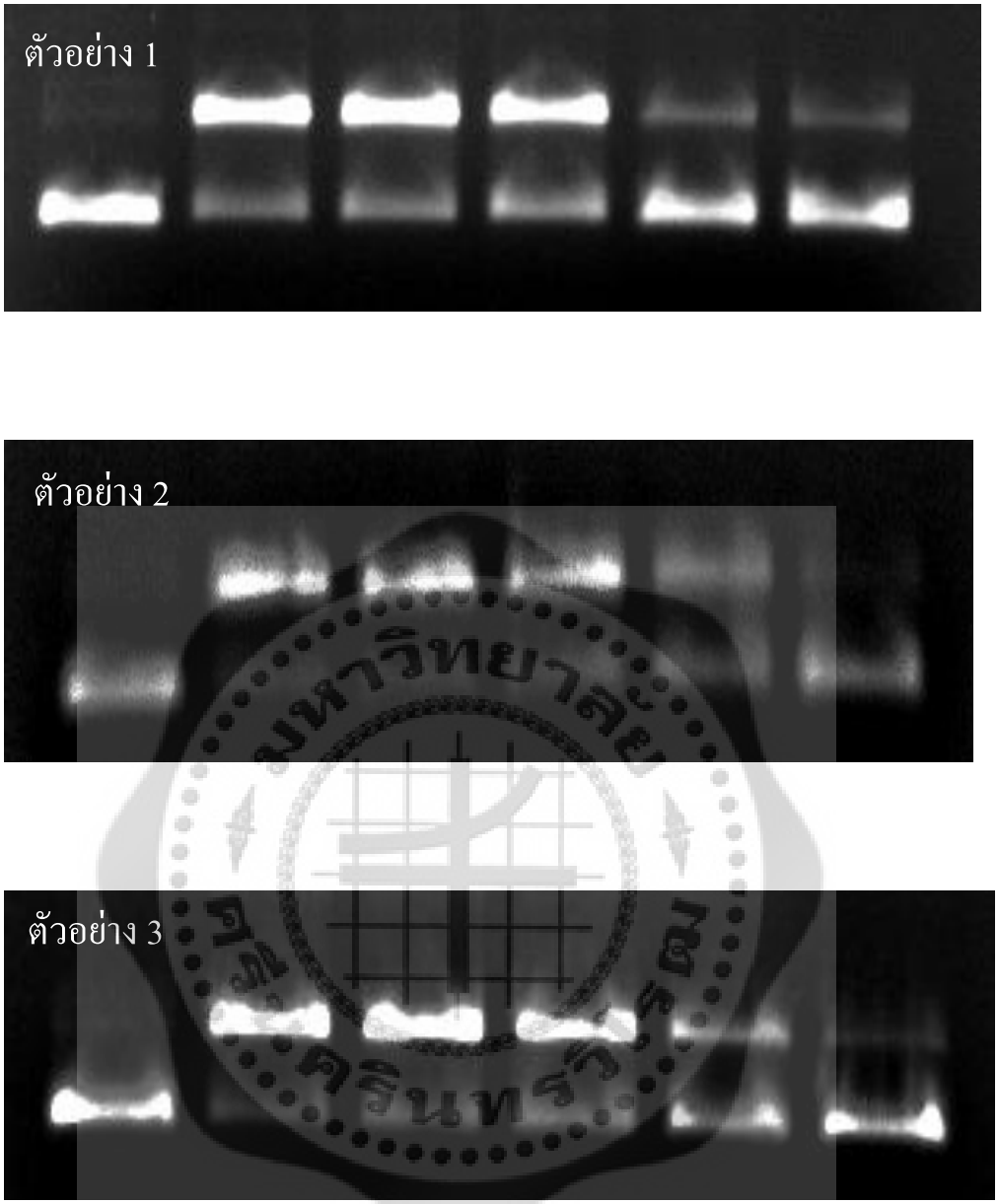
7. agarose gel electrophoresis ของพลาสมิด pBluescript ในกรณีต่างๆ



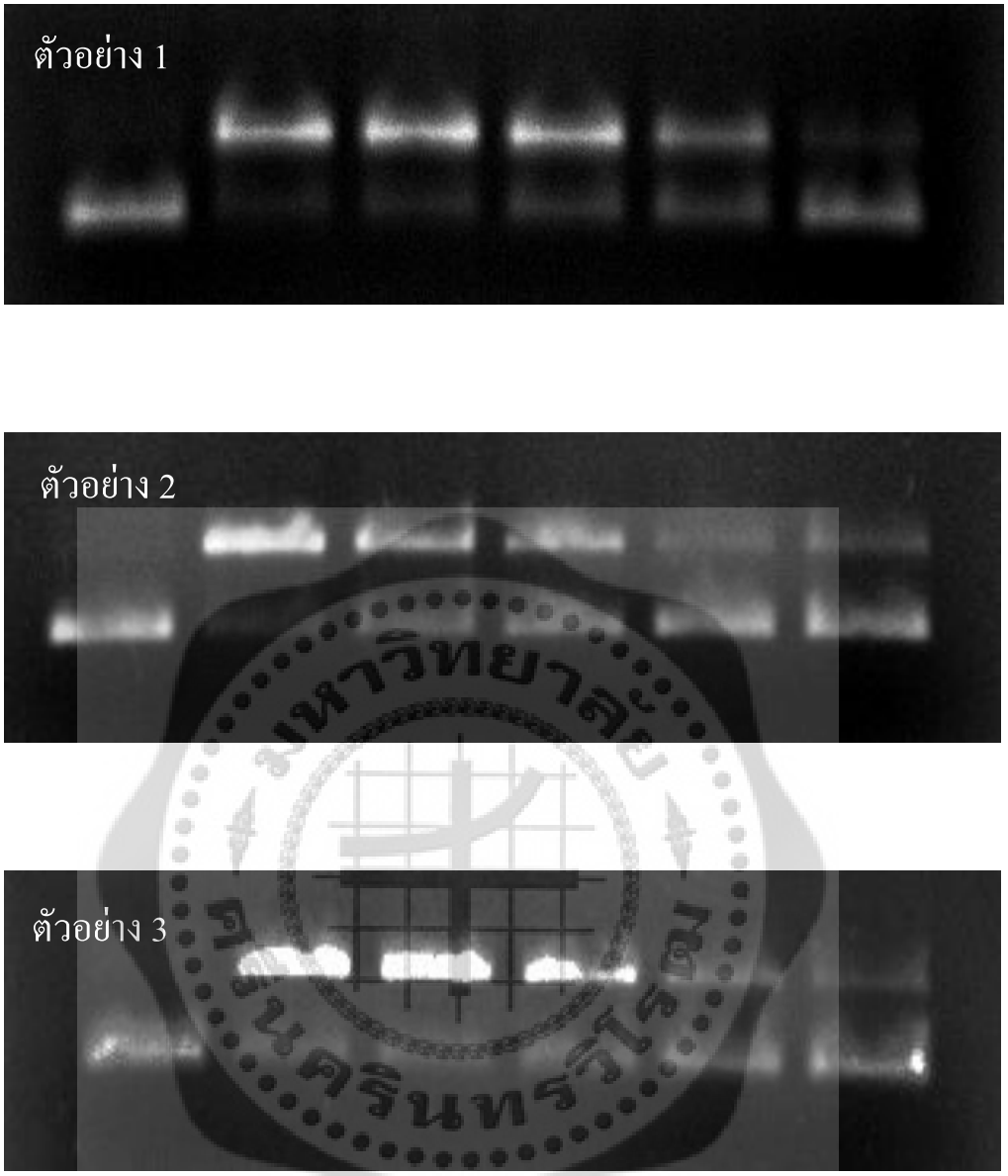
ภาพประกอบ 36 ก. รูปแบบ electrophoresis เมื่อพลาสมิด pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH



ภาพประกอบ 36 ข. รูปแบบ electrophoresis เมื่อพลาสมิด pBluescript ผสมกับ Trolox และทำปฏิกิริยากับ AAPH

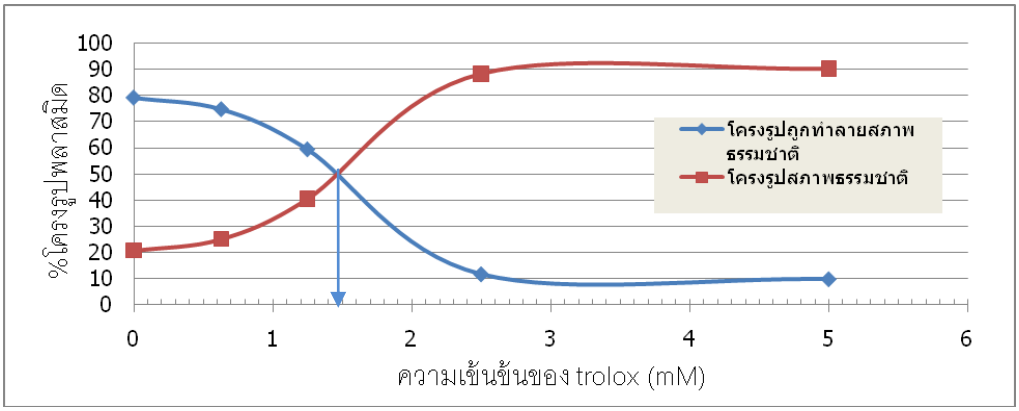


ภาพประกอบ 36 ค. รูปแบบ electrophoresis เมื่อ ผสมพลาสมิด pBluescript กับ น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย และทำปฏิกิริยากับ AAPH

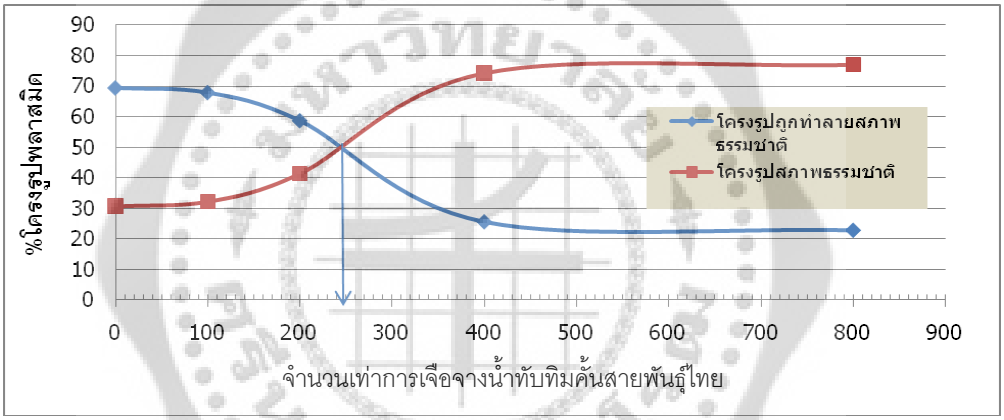


ภาพประกอบ 36 ง. รูปแบบ electrophoresis เมื่อ ผสมพลาสมิด pBluescript กับน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน และทำปฏิกิริยากับ AAPH

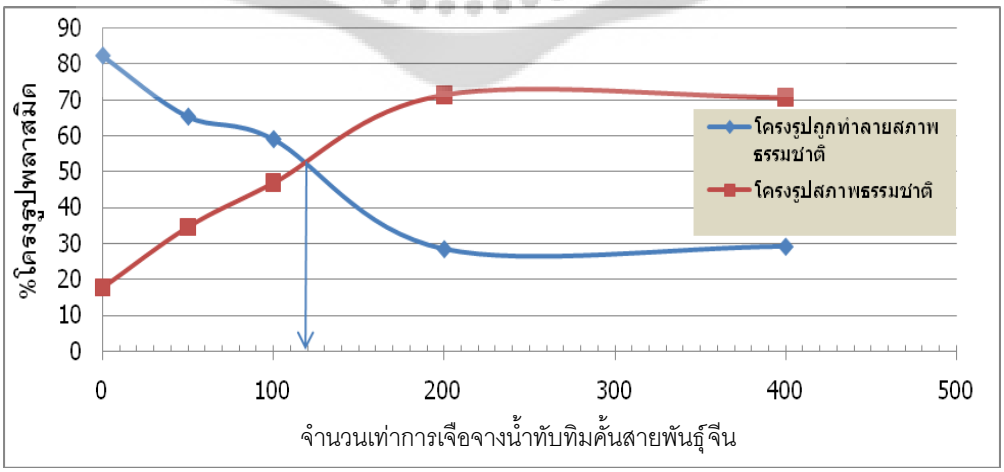
8. การหาค่า IC_{50} ของน้ำทับทิมคั้นต่อการป้องกันความเสียหายของพลาสมิด pBluescript



ภาพประกอบ 37ก การหาค่า IC_{50} Trolox



ภาพประกอบ 37ข การหาค่า IC_{50} น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย



ภาพประกอบ 37ค การหาค่า IC_{50} น้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน

ตาราง 10 ข้อมูลปริมาณโครงรูปต่างๆ ของพลาสมิดคิดเป็น raw volume ที่ได้จากsoftware Genetool

ตาราง 10ก พลาสมิด pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	AAPH	From	Row volume	%
1	0 (control)	open circular	1058321.88	10.9
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	8631104.00	89.1
		รวม 3 รูปร่าง	9689425.88	100
2	5 mM AAPH	open circular	3866346.88	33.9
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	7535173.50	66.1
		รวม 3 รูปร่าง	11401520.25	100
3	10 mM AAPH	open circular	6537301.50	53.8
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	5594387.00	46.2
		รวม 3 รูปร่าง	12121688.50	100
4	20 mM AAPH	open circular	9251228.00	70.1
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	3493708.25	29.9
		รวม 3 รูปร่าง	13194936.25	100
5	40 mM AAPH	open circular	15632859.00	91.1
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	1521163.50	8.9
		รวม 3 รูปร่าง	17154022.50	100
6	80 mM AAPH	open circular	14778399.00	98.0
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	300120.59	2.0
		รวม 3 รูปร่าง	15078519.59	100

ตาราง 10ข ผสมพลาสมิด pBluescript กับ Trolox แล้ว ทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	AAPH	From	Row volume	%
1	(control)	open circular	849286.75	4.3
		linear	770369.75	4.7
		supercoiled	16179800.00	91.0
		รวม 3 รูปร่าง	17799455.88	100
2	DNA + AAPH	open circular	17978788.00	86.5
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	2802348.00	13.5
		รวม 3 รูปร่าง	20781136.00	100
3	0.63 mMTrolox	open circular	18481168.00	75.5
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	5924287.00	24.3
		รวม 3 รูปร่าง	24405455.00	100
4	1.25 mMTrolox	open circular	16484070.00	63.5
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	9458323.00	36.5
		รวม 3 รูปร่าง	25942393.00	100
5	2.50 mMTrolox	open circular	4101110.00	18.5
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	18122012.00	81.5
		รวม 3 รูปร่าง	22228672.00	100
6	5.00 mM Trolox	open circular	2890067.25	15.8
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	15404678.00	84.2
		รวม 3 รูปร่าง	18294745.25	100

ตาราง 10 ค ผสมพลาสมิด pBluescript กันทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	AAPH	From	Row volume	%
1	control	open circular	842765.25	6.7
		linear	393917.88	3.2
		supercoiled	11280826.00	90.1
		รวม 3 รูปร่าง	12517509.13	100
2	DNA + AAPH	open circular	11594956.00	69.3
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	5135983.50	30.7
		รวม 3 รูปร่าง	16730939.54	100
3	1:800 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	12624587.00	67.8
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	6000056.50	32.2
		รวม 3 รูปร่าง	18624643.50	100
4	1:400 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	10931788.00	58.6
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	7710015.50	41.4
		รวม 3 รูปร่าง	18641803.50	100
5	1:200 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	3704490.25	25.7
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	10702535.00	74.3
		รวม 3 รูปร่าง	14407025.25	100
6	1:100 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	3230189.50	22.9
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	10845621.00	77.1
		รวม 3 รูปร่าง	14075810.50	100

ตาราง 10ง ผสมพลาสมิด pBluescript กันทับทิมคั้นสายพันธุ์จีนแล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

Track	AAPH	From	Row volume	%
1	control	open circular	1412820.13	13.7
		linear	804891.69	7.8
		supercoiled	8111266.50	78.5
		รวม 3 รูปร่าง	10328978.32	100
2	DNA + AAPH	open circular	10280988.00	79.6
		linear	308903.00	2.4
		supercoiled	2321645.50	18.0
		รวม 3 รูปร่าง	12911536.50	100
3	1:400 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	7797907.50	65.5
		linear	155709.56	1.3
		supercoiled	3945906.75	33.2
		รวม 3 รูปร่าง	11899523.81	100
4	1:200 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	7012958.00	55.8
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	5552557.50	44.2
		รวม 3 รูปร่าง	12565515.50	100
5	1:100 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	3844127.50	33.3
		linear	157497.81	1.4
		supercoiled	7551160.50	65.3
		รวม 3 รูปร่าง	11550785.81	100
6	1:50 เท่าอัตราส่วนเจือจาง	open circular	3487241.00	32.3
		linear	0.00	0.0
		supercoiled	7301399.50	67.7
		รวม 3 รูปร่าง	10788640.50	100

11. การคำนวณเป็นร้อยละของโครงรูปพลาสมิดที่ถูกทำลาย (open- circular+ linear) และ ไม่ถูกทำลายสภาพธรรมชาติ (supercoiled)

ตาราง 11ก พลาสมิด pBluescript ทำปฏิกิริยากับ AAPH

	Control	AAPH (mM)				
	0	5.0	10.0	20.0	40.0	80.0
open circular + linear	10.9	33.9	53.8	70.1	91.1	98.0
supercoiled	89.1	66.1	46.2	29.9	8.9	2.0

ตาราง 11ข ผสมพลาสมิด pBluescript กับ Trolox แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

			Trolox (mM)			
	Control	DNA+AAPH	0.63	1.25	2.50	5.00
open circular + linear	9.0	86.5	75.5	63.5	18.5	15.8
supercoiled	91.0	13.5	24.3	36.5	1.5	84.2

ตาราง 11ค ผสมพลาสมิด pBluescript กับน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์ไทย แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

			อัตราส่วนการเจือจาง (เท่า)			
	Control	DNA+AAPH	1:800	1:400	1:200	1:100
open circular + linear	9.9	69.3	67.8	58.6	25.7	22.9
supercoiled	90.1	30.7	32.2	41.4	74.3	77.1

ตาราง 11ง ผสมพลาสมิด pBluescript กับน้ำทับทิมคั้นสายพันธุ์จีน แล้วทำปฏิกิริยากับ AAPH

	อัตราส่วนการเจือจาง (เท่า)					
	Control	DNA+AAPH	1:400	1:200	1:100	1:50
open circular + linear	21.5	82.0	66.8	58.8	34.7	32.3
supercoiled	78.5	18.0	33.2	44.2	5.3	67.7

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นาย ฉลองรัตน์ หมื่นขวา
วันเดือนปีเกิด	11 พฤษภาคม 2525
สถานที่เกิด	อ.จตุรพักตรพิมาน จ.ร้อยเอ็ด
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	242 ถ.พหลโยธิน44 แขวง เสนานิคม เขต จตุจักร จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10900
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์ ระดับ ปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนจตุรพักตรพิมานรัชดาภิเษก จ.ร้อยเอ็ด
พ.ศ. 2547	วท.บ.เคมี จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง จ.กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2555	กศ.ม.เคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ