รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการส่งเสริมอาชีพการเลี้ยงไก่ด้วยสมุนไพรเพื่อลดต้นทุนการผลิตไก่ ในจังหวัดบุรีรัมย์

Project of Vocational Promoting for Chicken Raising with Herbs to Reduce a Capital in Buriram Province

สมหมาย ปะติดังโข และคณะ

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

เมษายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการส่งเสริมอาชีพการเลี้ยงไก่ด้วยสมุนไพรเพื่อลดต้นทุนการผลิตไก่ในจังหวัดบุรีรัมย์

Project of Vocational Promoting for Chicken Raising with Herbs to Reduce a Capital in Buriram Province

สมหมาย ปะติตังโข

วรพล เองวานิช

กิ่งแก้ว ปะติตังโข

ครรชิต พิระภาค

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

เมษายน 2555

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

หัวข้อโครงการ โครงการส่งเสริมอาชีพการเลี้ยงไก่ด้วยสมุนไพร เพื่อลดต้นทุนการผลิตไก่ในจังหวัดบุรีรัมย์

ผู้วิจัย สมหมาย ปะติตังโข และคณะ

ปีที่ทำวิจัย 2555

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการนำเปลือกเมล็ดมะขามมาทำการสกัดสารโพลีฟีนอลด้วยแอลกอฮอลล์ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารไก่เนื้อ โดยเปลือกเมล็ดมะขาม 1 kg สกัดได้สารโพลีฟีนอลที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและไม่เป็นพิษจำนวน 200 g เมื่อหาปริมาณโพลีฟีนอลรวมจะได้ค่าเฉลี่ย 18.085 ppm ที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง 100 ppm การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่ค่า IC_{50} 19.59 ppm การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดมีความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ซึ่งได้ปริมาณ Fe^{2+} 0.864 ppm ส่วนการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี $ABTS^{+}$ พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ Radical Scavenging activity เป็น 51.389 ppm การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อทำให้ไก่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันและประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงขึ้น รวมถึงทำให้ปริมาณไขมันในช่องท้องของไก่เนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับระดับที่เหมาะสมในการเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อ คือ ที่ระดับ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตไก่เนื้อดีที่สุด ผลจากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการเลี้ยงไก่เนื้อในระดับครัวเรือนและทั้งยังสามารถขยายไปในระดับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

Title: **Project of Vocational Promoting for Chicken Raising with Herbs to Reduce a Capital in Buriram Province**

Author: Sommai Patitungkho et al.

Academic year: 2012

Abstract

This study aimed to extract polyphenol contents from tamarind seed coats using ethanol as a solvent. The polyphenol contents then were mixed as broiler feed.

The one-kilogram tamarind seed coats were extracted as non-toxic polyphenol contents, totaling 200 grams. The extracted polyphenol contents at the concentration 100 ppm were found the mean at 18.085 ppm. The study of antioxidant activity by DPPH method seed coats do work well at IC_{50} 19.59 ppm, antioxidant activity by FRAP method found that it could reduce from Fe^{3+} to Fe^{2+} that was Fe^{2+}0.864 ppm ; and antioxidant activity by $ABTS^{+}$ method found that it could do the antioxidant activity by $ABTS^{+}$ method, valued 51.389 ppm. The extract of tamarind seed coats helped increase broiler weight, promoted everage growth, and significantly help decrease fat in abdominal carity ($p<0.05$). The proper ratio of the tamarind seed coat extract was 300 mg. per one kilogram feed. It was revealed that the polyphenol contents from tamarind seed coats affected the chicken raising. The results of this study were beneficial for raising broilers not only for family member consumption but also for industrial business.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักสำนักบริหารโครงการวิจัย ในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูง

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.โกวิท เชื่อมกลาง อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ขอขอบคุณ ผศ.สมเกียรติ กัลยพฤกษ์ รองอธิการบดี ฝ่ายวิจัยและประกันคุณภาพการศึกษา ขอขอบคุณ อาจารย์พิสมัย ประชานันท์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ขอขอบคุณ รศ.ดร.วรพล เองวานิช คุณคุณธงชัย บุญสอน ผู้ร่วมวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม อาจารย์ธัญญา คงนวลอินทร์ ผู้ช่วยนักวิจัยจากวิทยาลัยเกษตรกรรมและเทคโนโลยี มหาสารคาม ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำด้วยดีตลอดมา จนทำให้การวิจัยนี้สำเร็จ และ ขอขอบคุณ บุคลากรของสถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้การสนับสนุน และอำนวยความสะดวกต่อ กิจกรรมในการดำเนินงานการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงอย่างดี

สมหมาย ปะติตังโข และคณะผู้วิจัย

23 เมษายน 2555

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก
บทคัดย่อภาษาไทย ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง ฉ
สารบัญภาพ ช
สารบัญกราฟ ซ

บทที่

1 บทนำ **1**
หลักการและเหตุผลของการทำวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
กรอบแนวคิดของการวิจัย 3
ขอบเขตของการวิจัย 3
การให้คำนิยามศัพท์เชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย 4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **6**
บทนำ 6
พืชสมุนไพร 6
การสกัด 9
อนุมูลอิสระ (Free Radical) 10
ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง 11
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) 12
การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม 15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 20
3 สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง **29**
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 29
สารเคมี 31
วิธีดำเนินการวิจัย 32

บทที่ **หน้า**

4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล **39**
บทนำ 39
การสกัดโพลีฟีนอลจากเปลือกเมล็ดมะขาม 39
การหาปริมาณฟีนอลรวม (Folin ciocaltev sphenol reagent) 39
ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด 41
การตรวจหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 44
ผลการถ่ายทอดเทคนิคการเลี้ยงไก่เนื้อสู่ชุมชน 49
อภิปรายผลการทดลอง 50
5 สรุป วิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ **52**
บทนำ 52
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 52
ข้อเสนอแนะ 53
บรรณานุกรม **55**
ประวัตินักวิจัย **60**

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

2.1 แสดงชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง 12

2.2 แสดงวิธีวิเคราะห์การหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ 16

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 29

4.1 ผลการศึกษาสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในการหาปริมาณฟีนอลรวม 39

4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการหาปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 40

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเทคนิค DPPH 41

4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ 42

4.5 ผลการศึกษา Standard concentration สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 42

4.6 แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 43

4.7 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามด้วยเทคนิค ABTS 44

4.8 การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อสมรรถนะการผลิตและซากในไก่เนื้อ 45

4.9 การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในการเลี้ยงไก่เนื้อ 47

4.10 การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการเลี้ยงไก่เนื้อ 48

สารบัญกราฟ

กราฟ **หน้า**

4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของ Phenolic content เมื่อนำค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐานจะทำให้ทราบปริมาณฟีนอล 40

4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 41

4.3 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP 43

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 แสดงกลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ	12
2.2 แสดงโครงสร้างของวิตามินอี	13
2.3 แสดงโครงสร้างของวิตามีนซี	14
2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของวิตามินเอ	14
2.5 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์	14
2.6 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาในการรีดิวซ์ Fe(III) ให้เป็น Fe(II)	19
2.7 แสดงกลไกการต้านอนุมูล DPPH	20
3.1 ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล	32
3.2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอล	33
3.3 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH	34
3.4 แผนผังหน่วยการทดลอง	37
4.1 การถ่ายทอดความรู้เทคนิคการเลี้ยงไก่เนื้อด้วยสมุนไพรให้กับตัวแทนชาวบ้าน	40

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำ

ในบทที่ 1 นี้ ผู้วิจัยได้นำเสนอหลักการและเหตุผลของการทำวิจัย วัตถุประสงค์ของการวิจัย กรอบแนวคิดของแผนการวิจัย ขอบเขตของการวิจัย การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ซึ่งขอนำเสนอตามลำดับขั้นดังนี้

1.2 หลักการและเหตุผลของการทำวิจัย

ไก่เนื้อเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญและเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากไก่เนื้อมีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและใช้เวลาในการเลี้ยงที่สั้น ดังนั้นจึงควรมีการเพิ่มการส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเลี้ยงไก่เนื้อให้มีผลผลิตที่ดีนั้นจะต้องขึ้นอยู่กับการจัดการฟาร์มที่ดี ทั้งทางด้านอาหาร การสุขาภิบาลและการจัดการให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับไก่ในแต่ละช่วงอายุ ปัญหาหลักของการเลี้ยงไก่เนื้อในประเทศไทย คือ สภาพอากาศ เพราะประเทศไทยเป็นประเทศที่ร้อนชื้น ซึ่งถ้าอุณหภูมิสภาวะแวดล้อมสูงจะทำให้ไก่เกิดความเครียดและยังส่งผลตามมาหลายประการ เช่น ปัญหาการกินอาหาร อัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการให้อาหาร (รวีวรรณ โสธะโร. 2531 : 52-53) นอกจากนี้การเลี้ยงไก่ก็ยังประสบปัญหา การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น เนื่องมาจากการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายมากกว่าส่วนที่ร่างกายจะทำลายได้หมด เช่น ไก่เมื่ออยู่ในภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน (Sahin, K. et al. 2002); Lin, Hai, Eddy Decutpere and Johan Buyse. 2006) เป็นต้น ซึ่งภาวะดังกล่าวมีผลทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อในอวัยวะ หรือเกิดภาวะลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) ในร่างกายไก่ได้ (Sahin, K. 2000)

สมุนไพรมีหลายชนิดที่ต้องการศึกษาคือ มะขามซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นซึ่งพบเห็นได้ทั่วไป ผลมะขาม (*Tamarindus indica* L.) มีคุณค่าทางอาหารและสุขภาพหลายด้าน เนื้อมะขามใช้ประกอบอาหารทำให้มีรสชาติอาหารอร่อย ทำเป็นเครื่องดื่มแก้กระหายน้ำ และใช้เป็นยาระบายท้องได้ดี เมล็ดมะขามมีส่วนประกอบสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะเนื้อในของเมล็ดมะขามมีสารอาหารหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เส้นใยอาหาร โปรตีน วิตามิน เช่น ไนอะซิน ไธอามีน โรโบฟลาวิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ฟอตเฟต และมีสารสำคัญทางชีวภาพ เช่น สารกระตุ้น ภูมิคุ้มกันคือ เบต้า-กลูแคน สารต้านการติดเชื้อ และสารฆ่าพยาธิ ฯลฯ ส่วนที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีสารสำคัญทางชีวภาพหลายชนิด เช่น แอนติออกซิแดนท์ โอลิโกเมอริก โพแอนโทร ไซยานิดิน (oligomeric proanthocyanidins)

(OPC) ซึ่งเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันจากสารเคมีและรังสีอัลตราไวโอเลต และต่อต้านการอักเสบ

เมล็ดมะขามเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากการรับประทานและจากอุตสาหกรรมมะขาม เปลือกหรือส่วนนอกของเมล็ดมะขามเป็นส่วนที่มีสีแดงเข้มและมีรสฝาดอยู่มาก จากรายงาน พบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ซึ่งวัดโดยวิธีการยับยั้งการเกิดสีในปฏิกิริยา ABTS / metmyoglobin / H_2O_2 สูงมากเมื่อเทียบกับส่วนต่าง ๆ และเมล็ดของพืชชนิดอื่น ๆ (Pumthong. 1999) จากการศึกษาของ Pumthong (1999) พบว่าชีวเคมีของเปลือกเมล็ดมะขามมีสารพวก 2-hydroxy 3′,4′dihydroxyacetophenone (TAO), methyl 3,4 -dihydroxybenzoate (TA1), 3,4 - dihydroxyphenyl acetate (TA2) และ (-)- epicatechin (TA2) (Tsuda et al. 1994) เมื่อศึกษาโดยวิธีไทโอบาบิทูริก แอซิด รีแอกทีฟ ซับสะแตนซ์ (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) พบว่า TAO, TA1 และ TA2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามจะยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 ºC เป็นเวลา 2 ชม. และที่ pH 5.0 จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าที่ 3.0 7.0 และ 9.0 (Tsuda et al. 1995) ตามลำดับ

ดังนั้นการศึกษานี้มุ่งเน้นศึกษาระดับของสารโพลีฟีนอลที่เหมาะสม สำหรับช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต และลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นในไก่เนื้อ

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

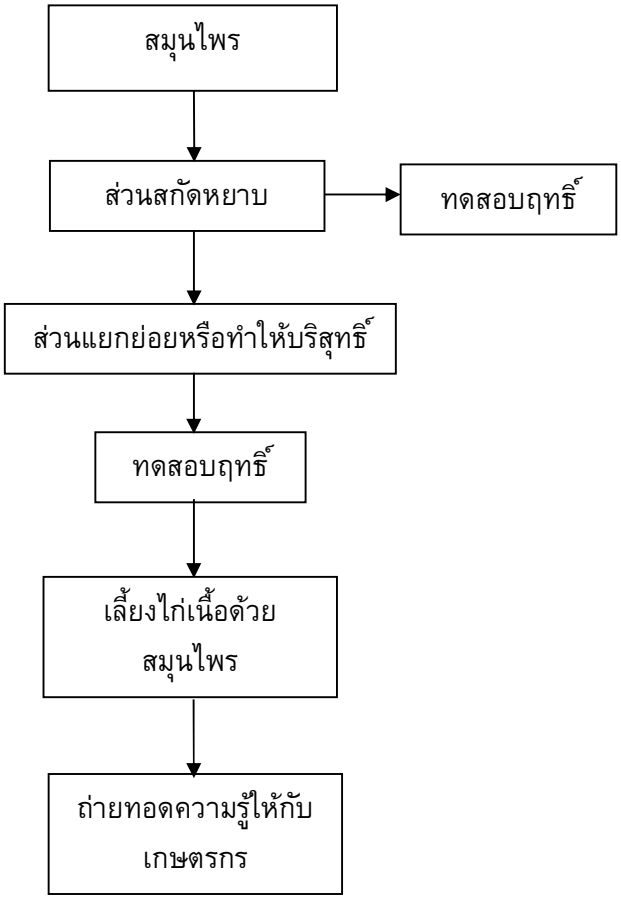
1.3.1 เพื่อศึกษาระดับของสารโพลีฟีนอล และฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

1.3.2 เพื่อศึกษาผลของสารโพลีฟีนอลที่สกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น ช่วยกระตุ้นหรือเสริมการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ

1.3.3 เพื่อหาระดับของโพลีฟีนอลที่เป็นสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่เหมาะสมสำหรับไก่เนื้อ

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มีกรอบแนวคิดดังแผนภาพข้างล่างนี้



กรอบแนวคิดการวิจัยเลี้ยงไก่เนื้อด้วยสารสกัดสมุนไพร

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้มีขอบเขตดังนี้

1.5.1 ด้านการทดลอง

1.5.1.1 การสกัดสารและตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมล็ดมะขาม โดยนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่ได้มาตรวจหาค่าวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยใช้วิธี DPPH, วิธี $ABTS^{+}$ และ วิธี FRAP

1.5.1.2 นำไก่คละเพศอายุ 1 วันจำนวน 180 ตัว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design; CRD) แบ่งเป็นกลุ่ม 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้ไก่จำนวน 10 ตัว จำนวน 18 หน่วยทดลอง ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ให้ผงมะขาม 100 มิลลิกรัม กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ให้ผงมะขาม 200 มิลลิกรัม กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ให้ผงมะขาม 300 มิลลิกรัม กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่ให้ผงมะขาม 400 มิลลิกรัม กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มที่ให้ผงมะขาม 500 มิลลิกรัม สภาพการจัดเลี้ยงเลี้ยงไก่ในโรงเรือนหน่วยทดลองละ 10 ตัว ระยะเวลาในการเลี้ยง 42 วัน เลี้ยงในโรงเรือนแบบปิด ให้น้ำกินตลอดระยะเวลาการทดลอง ให้อาหารตามการแบ่งกลุ่มการทดลอง

1.5.2 การเตรียมโรงเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง

การเตรียมโรงเรือน ทำความสะอาดโรงเรือนรวมทั้งบริเวณรอบโรงเรือน อุปกรณ์การเลี้ยงไก่ และฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ รมควันฆ่าเชื้อโรยปูนขาว นำแกลบมารองพื้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหนา 5 เซนติเมตร และเตรียมอุปกรณ์ให้น้ำ ให้อาหารอย่างเพียงพอ

1.5.3 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ไก่ทดลองคละเพศ อายุ 1 วันจำนวน 180 ตัว นำมาเลี้ยงไว้เพื่อให้สัตว์ปรับสภาพจนไก่อายุถึง 21 วันจึงทำเครื่องหมายติดเบอร์ที่แข้ง ไก่ทุกตัวได้รับน้ำและอาหารเต็มที่ตลอดการทดลอง

1.5.4 โปรแกรมการให้วัคซีน

1.5.4.1 ไก่อายุ 7 วัน ให้วัคซีนป้องกันโรคนิวคลาสเซิล

1.5.4.2 ไก่อายุ 14 วัน ให้วัคซีนป้องกันโรคฝีดาษ

1.5.4.3 ไก่อายุ 21 วัน ให้วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบ

1.5.5 การเตรียมอาหารสัตว์ทดลอง

ไก่เล็กจะใช้อาหารไก่เนื้ออายุ 0 ถึง 3 สัปดาห์ จนไก่อายุที่ 21 วันเปลี่ยนอาหารมาเป็นไก่ระยะรุ่น 3 ถึง 6 สัปดาห์

1.5.6 ศึกษาต้นทุนการผลิต

1.5.7 การถ่ายทอดสู่ชุมชน

นำผลที่ได้ไปถ่ายทอดให้กับชุมชน

1.6 การให้คำนิยามศัพท์เชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

1.6.1 สมุนไพร (Herb) หมายถึง พืชที่นำมาใช้ทำยา ส่วน ยาสมุนไพร หมายถึง ยาที่ได้จากส่วนของพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ซึ่งยังไม่ได้ผสมปรุง หรือแปรสภาพ

1.6.2 สมบัติทางชีวภาพ (Biological properties) หมายถึงปรากฏการณ์ที่สารประกอบที่สังเคราะห์ได้แสดงศักยภาพในการยับยั้ง การฆ่าเซลล์ของเชื้อโรคหรือเนื้อร้าย หรือขัดขวาง การทำงานของสารที่เป็นพิษ ตลอดจนแบคทีเรียที่ก่อโรค

1.6.3 สมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (Physicochemical properties) หมายถึง องค์ประกอบที่จะบ่งบอกลักษณะต่าง ๆ ของสารประกอบที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาเคมี เพื่อเป็นตัวชี้นำเบื้องต้นของยาที่สังเคราะห์ได้

1.6.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หมายถึง สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่นได้

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ได้เทคนิคการสกัด และการทำให้สารที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์

1.7.2 ทราบสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารที่สกัดได้

1.7.3 ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดได้ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH, FRAP และ $ABTS^{+}$

1.7.4 ได้สารต้านอนุมูลอิสระ ลดภาวะเครียดออกซิเดชั่นในไก่เนื้อ ทำให้ไก่มีสุขภาพดี และช่วยให้ไก่กินอาหารได้มาก

1.7.5 ได้แนวทางการเพิ่มผลผลิตไก่เนื้อด้วยเทคนิคใหม่ๆ

1.7.6 เผยแพร่ผลงานในวารสารที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร

1.7.7 หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ กรมวิชาการเกษตร เกษตรจังหวัด เกษตรอำเภอ กลุ่มเกษตรกรที่เลี้ยงไก่ เป็นต้น

1.7.8 ได้พัฒนานักวิจัยใหม่เพิ่มขึ้น

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้ให้รายละเอียดในสิ่งต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.1.1 พืชสมุนไพร

2.1.2 การสกัด

2.1.3 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

2.1.4 ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

2.1.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

2.1.6 การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity, TAC)

2.1.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2 พืชสมุนไพร

สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีประวัติควบคู่กับชีวิตของมวลมนุษย์มายาวนาน โดยใช้สมุนไพรในการบำบัดรักษาโรคมาแต่โบราณกาลด้วยการลองผิดลองถูก หากพืชสมุนไพรชนิดใดให้ประโยชน์ด้านการรักษาโรค ก็จะจดจำถ่ายทอดสืบต่อกันไปทำให้เกิดเป็นยากลางบ้าน (Folklore medicine) ใช้กันในชุมชนเล็กๆ หรือเป็นยาแผนโบราณ (Traditional medicine) ใช้กันในชุมชนใหญ่ๆ เมื่อพูดถึงสมุนไพรในความรู้สึกของคนทั่วๆ ไป มักจะนึกถึงเฉพาะยาที่ได้จากพืชเท่านั้น แต่จริงๆ แล้วสมุนไพรหมายถึงยาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุ และจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันยาที่ได้จากสัตว์และแร่ธาตุยังไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย เช่น ยาจากคางคก ซึ่งพบในต่อมใต้ตามีสีขาวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำเมื่อทำให้แห้งมีบิวฟาโทลิน (Bufatolin) และบิวโฟลิน (Bufolin) เป็นสารสำคัญใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ แก้ปวด แก้ไอ แก้คัน ฯลฯ ส่วนอื่นๆ ของสัตว์หรือสัตว์ทั้งตัวที่นำมาใช้เป็นยา ได้แก่ เขากวางอ่อน ดีงู ดีหมี ตุ๊กแก ไส้เดือน เป็นต้น สำหรับแร่ที่ใช้เป็นยาบ่อยๆ ได้แก่ เกลือแกง น้ำปูนใส เป็นต้น ในปัจจุบันสารสกัดจากสมุนไพรได้จากพืชเป็นส่วนใหญ่ และสารสกัดที่ยอมรับในเภสัชตำรับก็ล้วนแต่ได้มาจากพืช ส่วนสารที่ได้จากสัตว์และจุลินทรีย์ก็จะใช้เทคนิคจำเพาะที่แตกต่างออกไป

ในประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีป่าเขตร้อน (Tropical forest) ที่มีความหลากหลายของทรัพยากรทางชีวภาพ (Biological diversity resources) นั่นคือมีความหลายหลายของพันธุ์พืชสมุนไพร พันธุ์สัตว์ และแร่ธาตุ จึงมีการใช้ยาสมุนไพรในการรักษาโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ กัน

อย่างกว้างขวางในทุกครัวเรือนมาเป็นเวลาช้านาน เนื่องจากมีสมุนไพรเป็นจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้รักษาโรคได้ และบางชนิดประชาชนก็มีความคุ้นเคยในการนำมารักษาโรคด้วยตัวเอง ความนิยมในการใช้สมุนไพรได้ลดน้อยลงอย่างมากในช่วงที่อุตสาหกรรมผลิตยาเคมีสังเคราะห์แผนปัจจุบันได้เจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งประชาชนผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียงและความเป็นพิษของยาเคมีสังเคราะห์กันมากขึ้น ทำให้สมุนไพรเป็นที่สนใจและมีความสำคัญยิ่งขึ้นอีกครั้งหนึ่ง

การพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยาจะเป็นกลวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาเศรษฐกิจของประเทศได้ส่วนหนึ่ง กล่าวคือ เมื่อสมุนไพรบางชนิดได้รับการพัฒนาเป็นยาแล้ว ประชาชนนิยมใช้อย่างแพร่หลาย ก็จะทำให้สมุนไพรชนิดนั้นเป็นพืชเศรษฐกิจได้และสามารถลดการนำเข้าบางส่วน นอกจากนั้นการนำสมุนไพรมาใช้เป็นยายังสอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลในเรื่องการให้ประชาชนมีความสามารถในการพึ่งตนเองได้ในทางสาธารณสุขอีกด้วย

ความสำคัญของยาจากพืชสมุนไพร

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรเป็นอย่างมากทั้งด้านอุตสาหกรรมยา อาหารและ เครื่องสำอางเนื่องจากเริ่มประจักษ์ถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียง และความเป็นพิษของสิ่งสังเคราะห์หรือยาแผนปัจจุบันกันมากขึ้น ประกอบกับการวิจัยค้นคว้ายาตัวใหม่ๆ จากพืชสมุนไพรต่างๆ เช่น อนุพันธ์อาเทมิซินิน (Artemisinin derivatives) ได้แก่ อาทาซูเนต (Artesunate) และอาเทมีเทอร์ (Artemether) เป็นสารพวกแลกโทน (Lactone) จากต้นซิงเฮา (*Arteisia annua L.*) ในวงศ์คอมโพสิเต (Compositae) ใช้เป็นยาต้านมาลาเรียที่ออกฤทธิ์รวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ โดยออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดได้มากกว่าร้อยละ 95 และจะหมดไปจากกระแสเลือดภายใน 24 ชั่วโมงหลังให้ยา หรือสารในกลุ่มไพรีทริน (Pyrethrin) ที่สกัดได้จากดอกไพรีทรัม (*Pyrethrum cinerarifilium* Trev.) ในวงศ์คอมโพซิเต ใช้เป็นยาฆ่าแมลงทั้งประเภทเคี้ยวและดูด รวมทั้งแมลงรบกวนภายในบ้าน เช่น มด ยุง แมลงวัน ไพรีทรินจะสลายตัวได้ง่าย ทำให้ไม่มีปัญหาการตกค้างเหมือนยาฆ่าแมลงแบบสังเคราะห์และมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน Plaunotol เป็นสารจำพวกไดเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ (Diterpene alcohol) แยกได้จากใบเป้าน้อย (*Croton sublylatus* Kurz.) ในวงศ์ยูฟอร์เบียซีอี (*Euphorbiaceae*) ใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ มีฤทธิ์ข้างคียงน้อยกว่ายาสังเคราะห์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน เป็นต้น ทำให้สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบเคมีจำนวนมหาศาลที่มีประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และอุตสาหกรรม แม้ว่าปัจจุบันจะยังคงมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยาจำนวนมาก แต่ตัวยาสำคัญๆ หลายชนิดยังคงได้จากการสกัดจากพืชสมุนไพร เช่น จิงโกไลด์ บี (Ginkgolide B.) เป็นสารจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* L.) ในวงศ์จิงโกซีอี (*Ginkgoceae*) ซึ่งนิยมใช้กันมากในวงการแพทย์ทั่วโลก ช่วยป้องกันและรักษาความสมบูรณ์ของผนังเส้นเลือดฝอย ปรับระดับหมุนเวียนของเลือดและต่อต้านการอักเสบการบวม จึงใช้ในผู้ป่วยที่เลือดไปเลี้ยงสมองไม่พอ ผนังเส้นเลือดแดงทำงานไม่ปกติ ป้องกันการ

เกิดอัมพาต ใช้กับโรคที่เกี่ยวกับความชรา เช่น วิงเวียน ปวดศีรษะ หูอื้อ และใช้ปรับอารมณ์ ผู้สูงอายุ วงการแพทย์ปัจจุบันต้องอาศัยผลิตภัณฑ์ยาจากธรรมชาติ เพื่อเป็นแหล่งผลิตยาในการบำบัดรักษาโรคประมาณร้อยละ 40 ของตำรับยา รวมทั้งยาสามัญประจำบ้านล้วนมาจากธรรมชาติ นอกจากนี้สมุนไพรในรูปอาหารเสริมสุขภาพ (Health foods) หรือยาชง (Teas) ประเภทต่างๆ ที่มาจากธรรมชาติก็เป็นที่นิยมกันมากในตลาดทางเอเชียตะวันออก อเมริกา และยุโรป ปัจจุบันประเทศไทยมีการตื่นตัวในเรื่องอาหารเสริมสุขภาพเป็นอันมาก เช่น โสม (*Panax ginseng* C.A. Meyer) เชื่อว่าจะทำให้สุขภาพแข็งแรง กระชุ่มกระชวย มีกำลังวังชา และช่วยให้ร่างกายแข็งแรง มีกำลังวังชา และช่วยให้ร่างกายปรับตัวเขากับสภาวะต่างๆ ได้ดี หรือ เลซิทิน (Lecithin) ซึ่งพบมากในถั่วเหลือง (*Glycine max* Merr.) และไข่แดง มีคุณสมบัติช่วยบำรุงผิวพรรณให้นุ่มนวลสดใส ปราศจากริ้วรอย ช่วยละลายไขมันในกระแสเลือด ป้องกันการรวมตัวของคอเลสเทอรอลเป็นก้อน ไม่เกิดเป็นตะกอนจับตัวแข็ง ป้องกันโรคหัวใจ นอกจากนี้สารสำคัญในเลซิทีน คือ ฟอสฟาติดิวโคลีน (Phosphatidyl chloline) เมื่อเข้าสู่สมองจะเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคลีน (Acetylcholine) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท การรับประทานเลซิทินซึ่งมีฟอสฟาติดิวโคลีนสูง จะมีผลให้อะเซทิลโคลีนเพิ่มขึ้น เป็นการส่งเสริมบทบาทการทำงานของสมองในด้านการเรียนรู้และความจำ มีการใช้เลซิทินในการบำบัดและป้องกันโรคความจำเสื่อมในผู้สูงอายุด้วย

นอกจากนี้การใช้องค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรเป็นต้นแบบ (Model) ในการสังเคราะห์ยาด้วยกรรมวิธีทางเคมี เช่น ยาชาเฉพาะที่ (Local anesthetic) มีสูตรพื้นฐานของโคเคน (Cocaine) ซึ่งพบในใบโคคา (*Erythroxylum coca* Lamarck) วงศ์อีริโทซิลลาซีอี (*Erythroxylaceae*) เป็นต้น ยาแผนปัจจุบันส่วนหนึ่งได้จากการใช้เชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงสูตรเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้กลายเป็นยา (Partial synthesis) เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormone) ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันจะใช้ไดออสจีนิน (Diosgenin) จากพืชตระกูลไดออสโคเรีย (*Dioscorea* spp.)เป็นสารตั้งต้นผสมกับจุลินทรีย์ (Microbial transformation) เพื่อทำการสังเคราะห์โปรเจสเตอโรน (Progesterone) เพื่อใช้ในยาคุมกำเนิด

ปัจจุบันเครื่องสำอางส่วนใหญ่มีพืชสมุนไพรเป็นองค์ประกอบแทบทั้งสิ้น เช่น กรดแอลฟาไฮดรอกซี (α-Hydroxy acids, AHA) เป็นสารสกัดจากผลไม้นานาชนิด ซึ่งจะช่วยเร่งการหลุดลอกของเซลล์ชั้นบนสุดที่เสื่อม รวมทั้งรอยเหี่ยวย่นตื้นๆ พร้อมทั้งเสริมสร้างเซลล์ใหม่ให้เข้ามาแทนที่ จึงทำให้ผิวพรรณสดใสแลดูเนียน จึงนิยมใช้กันมากในผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่ และเครื่องสำอางบำรุงผิว นอกจากนั้นยังมีการใช้กรดบีตาไฮดรอกซี (β-Hydroxy acids) ซึ่งละลายได้ดีในไขมันมากกว่ากรดแอลฟาไฮดรอกซีในเครื่องสำอาง นอกจากนี้สารอโลอีน (Aloin) จากใบว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* L.) สามารถดูดรังสีอัลตราไวโอเลตได้ร้อยละ 20-30 จึงนำมาผสมในครีมป้องกันแดด

2.3 การสกัด

การที่จะสกัดตัวอย่างพืชจำเป็นต้องมีการทำให้พืชที่จะนำมาสกัดมีขนาดเล็กลง เพื่อทำให้การสกัดได้ผลดี ถ้าเป็นพืชสดอาจใช้มีดหั่นหรือทำให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นผสมกับตัวทำละลายที่ต้องการใช้สกัด ถึงแม้การสกัดพืชสดจะทำให้ได้สารมากและไม่เกิดการสูญเสียสารระหว่างขบวนการทำให้แห้ง แต่มีหลายกรณีที่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างพืชแห้ง เช่น ในกรณีที่สถานที่เก็บตัวอย่างกับที่ทำการสกัดอยู่ไกลกันจึงต้องเก็บโดยทำให้ตัวอย่างแห้งก่อนเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราและสะดวกต่อการขนส่ง การสกัดตัวอย่างพืชที่แห้งโดยจะใช้มีดหันเป็นชิ้นเล็กๆ หรือใช้เครื่องบดชนิด driven hammer mill ที่มีตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ ตามที่ต้องการ
เมื่อได้ตัวอย่างพืชที่เล็กลงแล้ว จะสกัดด้วยตัวทำละลาย การเลือกตัวทำละลายเป็นตัวแปรที่สำคัญอย่างมากในการสกัด ถ้าเลือกได้เหมาะสมการสกัดก็จะได้ผลดี การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารแต่ละชนิดในพืช อาศัยหลักการที่ว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วจะละลายสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายสารที่ไม่มีขั้วเช่นกัน (Like dissolves like) นอกจากนี้การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดยังต้องคำนึงถึงสมบัติเฉพาะตัวของตัวทำละลายนั้นๆ เช่น ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด ราคาไม่แพงเกินไป และที่สำคัญคือไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต สำหรับตัวทำละลายที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางคือแอลกอฮอล์ทั้งเมทานอลและเอทานอล เพราะมีสมบัติในการละลายกว้างและใช้ทำละลายเอมไซม์ในพืชได้ด้วย และเฮกเซนเหมาะกับสารที่ไม่มีขั้วจะใช้สกัดไขมันจากพืช เมื่อเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมได้แล้ว ต่อไปคือวิธีการสกัดซึ่งขึ้นกับชนิดของสารที่จะสกัดว่าทนต่อความร้อนได้หรือไม่ รวมถึงตัวทำละลายที่ใช้ วิธีสกัดมีหลายวิธีแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดต่างกัน ในที่นี้จะกล่าวถึงเพียงวิธีการสกัดโดยใช้ซอกเล็ทเท่านั้น

การสกัดโดยใช้ซอกเล็ท (Soxhlet Extraction)

การสกัดโดยใช้ซอกเล็ท (Soxhlet Extraction) เป็นการสกัดแบบต่อเนื่องใช้ความร้อนช่วย โดยการบรรจุตัวอย่างพืชในที่บรรจุ (Thimble) และใส่ในเครื่องซอกเล็ทที่ด้านล่างต่อกับขวดก้นกลมที่บรรจุตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ และให้ความร้อนด้วยเต่าให้ความร้อน (Heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ (Water bath) ด้านบนของเครื่องต่อกับเครื่องควบแน่น (Condenser) วิธีการสกัดจะเริ่มต้นเมื่อตัวทำละลายได้รับความร้อนจะระเหยและกลั่นตัวจากเครื่องควบแน่นเป็นของเหลวลงมาแช่ตัวอย่างพืชจนถึงระดับหนึ่งจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงในขวดก้นกลมและเมื่อได้รับความร้อนตัวทำละลายจะระเหยและกลั่นตัวใหม่วนเวียนอยู่เช่นนี้ โดยสารละลายในขวดก้นกลมจะเข้มข้นเรื่อยๆ ข้อดีของการสกัดด้วยวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการสกัดน้อย และไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย ข้อจำกัดหรือข้อเสียคือคืออาจมีสารบางอย่างถูกทำลายด้วยความร้อน

เมื่อสกัดสารจากพืชแล้ว สารสกัดที่ได้ต้องนำไปทำให้เข้มข้นก่อน เพื่อสะดวกในการแยกสารต่อไป การทำให้สารเข้มข้นทำได้โดยระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือแต่สารสกัด (Crude extract) วิธีการระเหยตัวทำละลายออก ที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ

1) การกลั่นลดความดัน (Distillation in vacuum) เป็นวิธีระเหยตัวทำละลายออกโดยลดความดัน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกที่อุณหภูมิต่ำ เครื่องมือที่ใช้เรียกว่า Rotary Evaporator โดยใส่สารสะลายสกัดในขวดก้นกลมหรือขวดรูปวงรีที่ต่อกับแกนหมุน เพื่อหมุนขวดก้นกลมในระบบมีเครื่องควบแน่นและขวดรองรับสารละลายที่กลั่นตัว ซึ่งต่ออยู่กับเครื่องปั๊มลดความดัน การทำงานเริ่มจากการให้ความร้อนที่ขวดบรรจุสารละลายสกัดซึ่งจะหมุนตลอดเวลาพร้อมกับลดความดันในระบบ เมื่อสารละลายกระทบเครื่องควบแน่นจะกลั่นตัวเป็นของเหลวเก็บไว้ในขวดรองรับสารละลาย เช่นนั้นไปเรื่อยๆ จนได้สารสกัด ซึ่งถ้าความเข้มข้นสูงจะมีลักษณะเหนียวหนืด ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดบรรจุสารสกัดที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว และควรเก็บสารสกัดไว้ในเครื่องทำความเย็น เช่น ตู้เย็น เพื่อป้องกันการเกิดเชื่อรา

2) การทำให้แห้งโดยการแช่แข็ง (Freeze Dry) โดยทั่วไปมักใช้กับสารละลายที่สกัดด้วยน้ำ เมื่อต้องการแยกน้ำออกจากสารสกัด ทำโดยใช้เครื่อง Lyophilizer หลักการคือแช่แข็งสารละลายสกัด ลดความดันในระบบจะดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำออกจากสารสกัดเหลือสารสกัดที่แห้งซึ่งมีสมบัติดูดความชื้นสูง ดังนั้นเมื่อถ่ายในภาชนะบรรจุแล้วต้องปิดให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้นในอากาศ

2.4 อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้หมายรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังร่วมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอนแต่ละอิเล็กตรอนแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล ทั้งนี้การสปินหรือการหมุนรอบตัวของอิเล็กตรอนทั้งสองจะสปินแบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอิสระที่อยู่ในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์เคมีของอนุมูลอิสระ คืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์เคมี เช่น อนุมูล $A^{\cdot}$ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโลเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดั้งนั้นอนุมูลอิสระจึงมีสมบัติเฉพาะ คือมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถอยู่ในสภาพอนุมูลอิสระได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีน้อยชนิดมาก เช่น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่

อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\bullet-}$) อนุมูลไฮโดรอกซี ($HO^{\bullet}$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\bullet}$) และอนุมูลซุปเปอร์ไฮดรอกซี ($HO^{\bullet}_2$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก ขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรือ อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($ON^{\bullet}$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซีมีความไวรองลงมา การเกิดอนุมูลอิสระมีหลายกลไกที่แตกต่างกันดังนี้

การแตกพันธะโควาเลนท์แบบโฮโมไลซิส

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

การเพิ่มอิเลคตรอนหนึ่งตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

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

การสูญเสียอิเลคตรอนหนึ่งตัวจากอะตอมที่เป็นกลาง

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

2.5 ชนิดและการเรียกชื่ออนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ หรืออนุมูล เป็นศัพท์ที่ใช้คู่กัน เหตุที่มีการตัดคำว่า **อิสระ** ออกเนื่องจากสมบัติที่ไวต่อปฏิกิริยาทำให้อนุมูลไม่คงตัวอยู่ในสภาพอิสระได้ ส่วนการที่ยังใช้คำว่าอิสระเนื่องจากต้องการเน้นถึงเหตุของความไวต่อปฏิกิริยา ซึ่งผลมาจากสภาวะความเป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวเป็นอิสระไม่มีคู่ นอกจากนี้การวิจัยพบว่า มีสารหลายชนิดที่ไม่อยู่ในสภาพอนุมูลแต่มีความเกี่ยวข้องกับอนุมูล และมีความไวต่อปฏิกิริยาสูง ดังแสดงในตารางที่ 2.1 สารเหล่านี้มีทั้งสารที่ให้กำเนิดสารอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีความคงตัวต่ำและสลายตัวได้ง่าย เช่น โอโซน หรือเป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นเกิดเป็นอนุมูล เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมถึงสารที่เป็นผลผลิตของอนุมูลที่อันตรายสูง ได้แก่ เปอร์ออกซีไนไตรท์ ซึ่งเรียกโดยรวมว่าสารไวต่อปฏิกิริยา (Reactive species, RS)

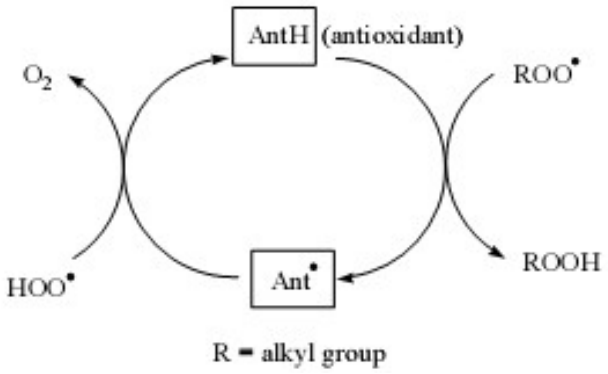
อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องทางชีววิทยา สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ทั้ง 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์

ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive Oxygen Species (ROS)	
Superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$	H_2O_2, Ozone O_3
Hydroxyl, $HO^{\bullet}$	Hydrobromous acid, HOBr
Hydroperoxyl, $HO_2^{\bullet}$	Hypochlorous acid, HOCl
Peroxyl, $RO_2^{\bullet}$	Signlet oxygen
Alkoxyl, $RO^{\bullet}$	Organic peroxides
Carbonate, $CO_3^{\bullet-}$	Peroxynitrite, $ONOO^-$
Carbon dioxide	Peroxylnitrous acid, ONOOH
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide, $NO^{\bullet}$	
Nitrogen Dioxide, $NO_2^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet-}$	
Reactive chlorine species (RCS)	
Aromatic chlorine, Cl	

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

การต้านอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อร่างกายของคนเราเหล่านี้สามารถกำจัดไปได้ด้วยสารบางชนิดที่เรียกว่า **สารต้านอนุมูลอิสระ** (Antioxidant) โดยสารต้านอนุมูลอิสระไปจับกับอนุมูลอิสระที่เป็นตัวปัญหา แล้วเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ๆ ขึ้นมาอีกเพราะมันจะรวมกันเองกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร แสดงวงจรการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงกลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ

จากภาพสามารถเขียนสมการแสดงการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดังนี้

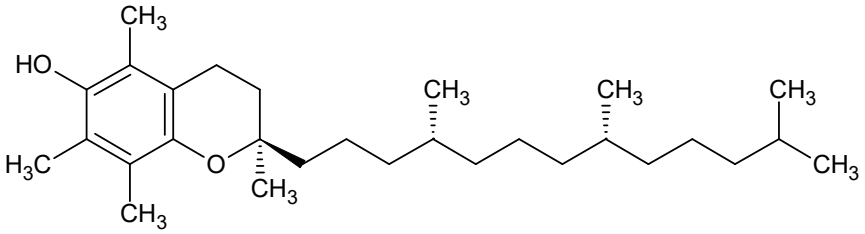
$$HOO^{\bullet} + AntH \longrightarrow HOOH + Ant^{\bullet}$$
$$O_2^{\bullet -} + AntH \longrightarrow HOO^{-} + Anti^{\bullet}$$
$$ROO^{\bullet} + AntiH \longrightarrow ROOH + Anti^{\bullet}$$
$$O_2^{\bullet -} + AntH \longrightarrow HOO^{\bullet} + Ant^{\bullet}$$

ร่างกายคนมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 2 วิธี

2.6.1 เอนไซม์ (Enzyme) ต่างๆ ในร่างกาย เช่น Superoxide dismultase (SOD), Superoxide reductase (SORs), Catalase (CatFe(II)H_2O_2 complex และ CatFe(III)H_2O_2 complex), Thioredoxin reductase (Trx), Glutathione peroxidase เป็นต้น โดยเอนไซม์เหล่านี้จะไปจับกับอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide หรือ Nitric oxide เป็นการตัดวงจรการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ต่างๆ ที่มีอยู่ในร่างกายนั้นมีปริมาณจำกัด ฉะนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอกร่างกาย เพื่อรักษาระบบสมดุลต่างๆ ในร่างกายให้ดำเนินต่อไปได้อย่างปกติ

2.6.2 อาหารหรือยาที่รับประทานเข้าไป เราสามารถที่จะเลือกรับประทานอาหารหรือยาที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น

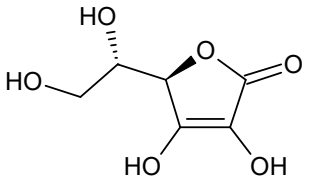
2.6.2.1 วิตามินอี (Vitamin E) เป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำมันจึงพบมากในน้ำมันพืชต่างๆ



Vitamin E (α-Tocopherol)

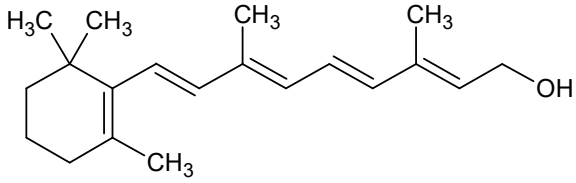
ภาพที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของวิตามินอี

2.6.2.2 วิตามินซี (Vitamin C) มีมากในพืช ผักสีเขียวและผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง พริกหยวก ส้ม มะนาว สับปะรด



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของวิตามีนซี

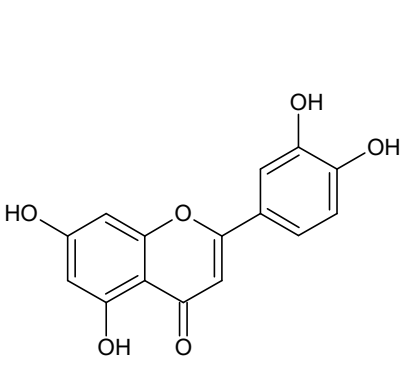
2.6.2.3 เบตาคาโรทีน (β-Carotene) รวมทั้งวิตามินเอ (ระบบการทำงานของร่างกายสามารถเปลี่ยน β-Carotene เป็น Vitamin A) มีมากในผักผลไม้ที่มีสีเหลืองส้ม เช่น มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง แครอท และผักใบเขียว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง บรอคเคอรี



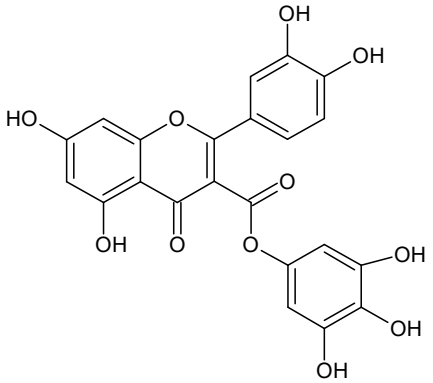
Vitamin A

ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของวิตามินเอ

2.6.2.4 อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ (Flovonoid derivatives) พบมาในพืช จำพวกชา กาแฟ โดยเฉพาะในชาเขียว และเมล็ดกาแฟสด



Luteolin



(-)-Epigallocatechin-3-gallate

ภาพที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

2.7 การศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระรวม

(Total Antioxidant Capacity, TAC)

เนื่องจากร่างกายและเซลล์มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิด จึงมีระบบควบคุมป้องกันไม่ให้มีอนุมูลอิสระที่เกินสมดุลที่ทำให้เกิดอันตราย ระบบควบคุมป้องกันประกอบด้วย

2.7.1 สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีทั้งโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อัลบูมิน เฟอร์ริติน และโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น วิตามินซี และยูริก เป็นต้น

2.7.2 เอนไซม์ขจัดอนุมูลอิสระมีหลายชนิดด้วยกัน

การใช้ดัชนีจากการหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระเดี่ยวๆ หรือวัดปริมาณการเกิดสารชีวโมเลกุลที่ถูกสารอนุมูลอิสระทำให้เสียหายเป็นดัชนีวัดสภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลว่ามีมากน้อยเพียงใดนั้น อาจไม่เป็นค่าที่สะท้อนถึงภาพรวมของภาวะออกซิเดชันของร่างกายหรือสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีการหาความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นการรวมองค์ประกอบทั้งหมดของสภาวะรีด็อกซ์ และใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะออกซิเดชันของรางกายโดยตรงด้วยการตรวจวัดจากเลือด พลาสมาและของเหลวที่ได้จากร่างกาย ในการวิเคราะห์มีหลักการสำคัญ 2 วิธีการคือ

2.7.2.1 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT) เช่น วิธี ORAC และวิธี TRAP

2.7.2.2 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron transfer, ET หรือ SET) เช่น วิธี FRAP และวิธี TEAC เป็นต้น

วิธีวิเคราะห์โดยใช้หลักการ HAT จะวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในเลือดหรือพลาสมาในการขจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow X^{-} + AH^{\bullet +}$$

วิธีนี้จะหาพลังงานที่ทำให้พันธะของอะตอมไฮโดรเจนแตกออก (Bond dissociation energy, BDE) สารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะมีค่า △BDE ประมาตร -10 กิโลแคลอรี/โมล และมีค่าความต่างศักย์ของการแตกตัว (Ionization potential, △IP) ต่ำกว่า – 36 กิโลแคลอรี/โมล ในการหาดัชนี TAC เป็นการวัดความสามารถในการแข่งขันกันในเชิงจลนศาสตร์ ปฏิกิริยา HAT จะไม่ขึ้นกับตัวทำละลายและค่า pH แต่หากมีสารรีดิวซ์หรือโลหะอยู่ด้วยจะทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธี HAT ซับซ้อนและส่งผลให้ค่าจากการวิเคราะห์สูงกว่าความเป็นจริง

ในการวิเคราะห์โดยใช้หลักการ SET หรือ ET เป็นการหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น ได้แก่ โลหะและอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจะขจัดอนุมูลโดยกลไก HAT และ SET ซึ่งให้ผลผลิตที่เหมือนกันในขั้นสุดท้าย แม้ว่าจะมีกลไกทางจลนศาสตร์และเกิดสารข้างเคียงที่แตกต่างกัน เมื่อรวมสมการที่ (1)-(3) ในกลไก SET จะให้ผลเช่นเดียวกันกับสมการของกลไก HAT ดังแสดง

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow X^{-} + AH^{\bullet+} \quad (1)$$

$$AH^{\bullet+} \xrightarrow{H_2O} A^{\bullet} + H_3O^{+} \quad (2)$$

$$X^{-} + H_3O^{+} \longrightarrow XH + H_2O \quad (3)$$

$$M(III) + AH \longrightarrow AH^{+} + M(II) \quad (4)$$

ในการวิเคราะห์จะเกิดกลไกทั้งสองคือ HAT และ ET ควบคู่กันไปเสมอ วิธี SET จะเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้โปรตอนหลุดออกจากโมเลกุล และการแตกออกเป็นไอออน ปฏิกิริยา SET จะลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น แสดงถึงความสามารถที่จะให้อิเล็กตรอนโดยที่โปรตอนหลุดออก สารต้านออกซิเดชันที่เกิดกลไก SET จะมีค่า Δ IP มากกว่า -45 กิโลแคลอรี/โมล ปฏิกิริยา ET จะช้าและใช้เวลานานกว่าปฏิกิริยาจะสิ้นสุดลง ดังนั้นการคำนวณค่า TAC จะหาปริมาณของสารที่เกิดขึ้นเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปว่าจะมีปริมาณลดลงร้อยละเท่าใด หากมากกว่าจะคำนวณหาค่าทางจลนศาสตร์ วิธี SET ซึ่งจะไวต่อวิตามินซีและกรดยูริก สารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวนวิธี SET ทำให้การวิเคราะห์มีความแปรปรวนสูง ตารางที่ 2.3 แสดงวิธีต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถรวมของการต้านอนุมูลอิสระ วิธีวิเคราะห์แบบนี้แบ่งเป็นการวัดโดยตรงและวัดโดยอ้อม

ตารางที่ 2.2 แสดงวิธีวิเคราะห์การหาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	**วิธีการวิเคราะห์**
Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	วิธีวัดโดยอ้อม HAT
Photochemiluminescence assay	วิธีวัดโดยอ้อม HAT
TEAC I ($ABTS^{\bullet+}$/ metmyoglobin)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
TEAC II ($ABTS^{\bullet+}$ with manganese dioxide Mn_2O)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
TEAC III ($ABTS^{\bullet+}$ with potassium persulfate)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
Diphenyl-1-picrylhydrazly assay (DPPH)	วิธีวัดโดยอ้อม SET
Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)	วิธีวัดโดยอ้อม HAT
The ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)	วิธีวัดโดยอ้อม SET

วิธีวิเคราะห์หาค่า TAC โดยอ้อม เป็นการวัดความสามารถในการยับยั้งหรือการขจัดอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดขึ้น ถือว่าเป็นวิธีวิเคราะห์โดยอ้อม ได้แก่ วิธี TRAP, ORAC และวิธี TEAC เริ่มด้วยการทำให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น และน้ำเลือด หรือพลาสมาเติมลงไป จากนั้นจึงวัดความสามารถในการยับยั้ง

อนุมูลอิสระ

1) วิธี TRAP วิธีนี้จะใช้สารประกอบเอโซ ABTS, ABTP หรือ AAPH, 2,2-azobis (2-amidopropane) ซึ่งสลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี ซึ่งหาปริมาณได้จากการที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นไปทำปฏิกิริยาออซิเดชันกับสาร ABTS เกิดอนุมูลที่มีสี $ABTS^{\bullet+}$ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 660, 734 และ 820 nm ซึ่งการวัดค่า TAC ทำโดยดูความสามารถของเลือด หรือพลาสมา ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อนำเลือดไปผสมจะทำให้เกิดสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ช้าลงหรือน้อยลง ทำให้มีสีจางลงซึ่งสามารถวัดปริมาณได้ การวิเคราะห์ทำได้ทั้งการวัดระยะเวลาที่ทำให้เกิดสีของ $ABTS^{\bullet+}$ หลังการเติมเลือดหรือพลาสมา หรือวัดปริมาณของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่เกิดขึ้นจากค่าการดูดกลืนแสงในเวลาที่กำหนด วิธีการวัดโดยการกำหนดเวลา ถึงแม้ว่าจะสะดวกและได้ค่าถูกต้องแม่นยำดีแต่เนื่องจากมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ให้เกิดสี และอัตราการเกิดออกซิเดชัน เข้ามามีบทบาททำให้การแปลผลซับซ้อน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีโดยการวัดพื้นที่ใต้เส้นกราฟ (AUC) ซึ่งจะให้ค่าที่ถูกต้อง แต่ยุ่งยากไม่สะดวกและต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ วิธี TRAP มีการพัฒนาต่อมาโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากระตุ้นเมทไมโอโกลบินเกิดอนุมูลเฟอร์ริลไมโอโกลบิน ทำปฏิกิริยากับ ABTS เกิดเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสี ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปในสารผสมที่ใช้ทดสอบ เลือดหรือสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะยับยั้งปฏิกิริยาทำให้มีสีจางลง วิธีนี้อาจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ λ_{max} = 734 nm วัดในเวลาที่กำหนดในจุดเดียว หรือวัดอัตราความเร็วในการเกิด $ABTS^{\bullet+}$ โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือระบุเวลาที่ใช้ก่อนเกิดปฏิกิริยา (lag time) หรือค่าระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อก

2) วิธี ORAC เป็นการวิเคราะห์โดยอ้อมอีกวิธีหนึ่งที่วัดความสามารถของสารทดสอบหรือเลือดในการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซีไม่ให้ทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยกลไก HAT การวิเคราะห์จะวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ โดยอนุมูลเปอร์ออกซีจะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์เป็นสารที่ไม่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ดังนั้นเมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะขจัดอนุมูลเปอร์ออกซีซึ่งทำให้มีแสงฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้นตามปริมาณและความแรงของสารทดสอบที่เติมลงไป

วิธีนี้จะใช้ β-Phycoerythrin (β-PE) แทน $ABTS^{\bullet+}$ โดย β-PE มีคุณสมบัติให้แสงฟลูออเรสเซนส์ที่ 565 nm เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงหรือรังสีที่มีความยาวคลื่นเท่ากับ 540 nm β-PE จะถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระทำให้คุณสมบัติในการให้แสงฟลูออเรสเซนส์เสียไป ดังนั้น

เมื่อผสมสารแอโซ AAPH ซึ่งสลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี ($ROO^{\bullet}$) จะทำให้เกิดแสงฟลูออเรสเซนส์ของ β-PE ลดลงดังสมการ 2 ดังนั้นการเติมซีรั่มหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในสารละลายทดสอบจะยับยั้งการสูญเสียแสงฟลูออเรสเซนส์ของ β-PE ดังสมการที่ 3 และ 4

$$R\text{-}N{=}N\text{-}R \longrightarrow N_2 + 2ROO^{\bullet} \quad (1)$$

$$ROO^{\bullet} + \beta\text{-PE} \longrightarrow ROOH + \text{oxidized-}\beta\text{-PE} \quad (2)$$

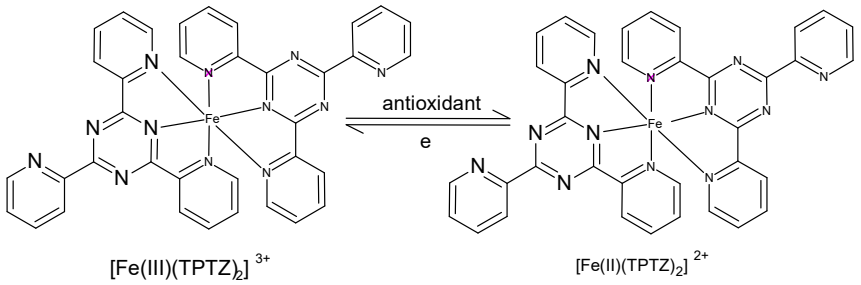
$$ROO^{\bullet} + \text{antioxidant} \longrightarrow ROOH + A^{\bullet} \quad (3)$$

$$ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow AOOA \quad (4)$$

ในเริ่มแรกใช้โปรตีนเบต้าไฟโคอีริทติน **(**β-PE**)** เป็นสารที่ให้แสงฟลูออเรสเซนส์ซึ่งต่อมาไม่เป็นที่นิยม เนื่องจาก β-PE มีความแปรปรวนสูงในการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและแสงฟลูออเรสเซนส์จะลดลงเมื่อถูกแสง นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลโดยเฉพาะโปรแอนโทไซยานิดินจะจับกับโปรตีน β-PE ทำให้ค่า ORAC มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง ปัจจุบันนิยมใช้ฟลูออเรสซีน หรือ ไดคลอโรฟลูออเรสซีน ซึ่งมีความคงตัวและไม่ว่องไวต่อปฏิกิยาจนเกินไป ในการวิเคราะห์จะติดตามปฏิกิริยาเป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อให้ได้ค่า ORAC ที่ถูกต้องสมบูรณ์จะวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการคำนวณพื้นที่ใต้เส้นกราฟ AUC ของการลดลงของแสง เมื่อเติมเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในสารละลายทดสอบ จะทำให้การลดลงของแสงเกิดช้ากว่าและน้อยกว่า

เพื่อกำจัดความแปรปรวนของสารเคมีและเครื่องมือ ผู้วิเคราะห์ค่า ORAC จะคำนวณเป็นค่าที่สมมูลกับสารมาตรฐาน Trolox equivalent (TE) มีหน่วยเป็นไมโครโมลเทียบเท่ากับโทรร็อกต่อตัวอย่างทดสอบหนึ่งลิตรหรือหนึ่งกรัม **(**μM ของ TE/L หรือ μM ของ TE/g**)**

3) วิธี FRAP เป็นการวิเคราะห์หาค่า TAC โดยตรง มีหลักการว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอนจึงเป็นสารรีดิวซ์ ดันนั้นจึงกล่าวได้ว่า TAC เป็นความสามารถในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กนี้จะถูกรีดิวซ์โดยเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส (Fe^{2+}-TPT) ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm



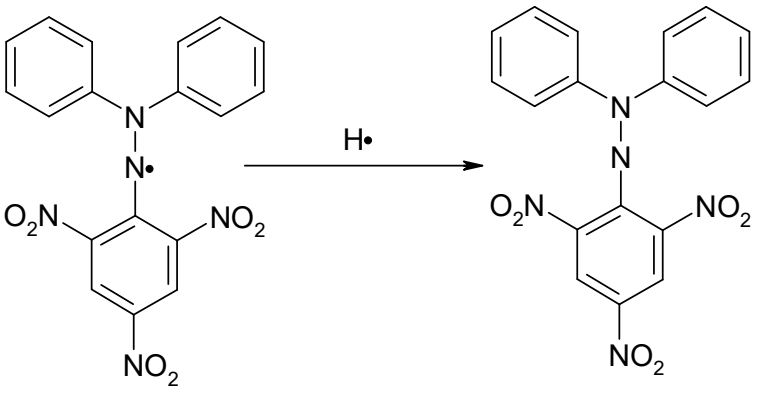
ภาพที่ 2.6 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาในการรีดิวซ์ Fe(III) ให้เป็น Fe(II)

วิธี FRAP จะวัดค่าต่างศักย์ของการรีดอกซ์ที่ค่าต่ำกว่า 0.7 โวลต์ ซึ่งมีค่าความต่างศักย์ของสมการรีดอกซ์ของ Fe^{3+}-TPTZ ดังนั้นวิธี FRAP สามารถใช้วัดรีดอกซ์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ แต่วิธี FRAP ไม่สามารถวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน (HAT) เพราะจะให้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

เนื่องจากความต่างศักย์รีดอกซ์ของ Fe^{3+}-TPTZ มีค่าใกล้เคียงกับค่าของ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งใช้ในวิธีวิเคราะห์ TEAC ดังนั้นสารต้านออกซิเดชันจำพวกเดียวกันที่มีโครงสร้างที่คล้ายกันจะทำปฏิกิริยาได้ทั้งวิธีวิเคราะห์แบบ TEAC และวิธี FRAP แม้ว่าทั้งสองวิธีมีการแตกต่างกันในเรื่องค่า pH โดยวิธี TEAC จะวิเคราะห์โดยทำปฏิกิริยาในสภาวะเป็นกลางและวิธี FRAP จะทำปฏิกิริยาที่ pH 3.6 เพื่อให้เหล็กละลายได้ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาที่สภาวะเป็นกรดจะลดค่าความต่างศักย์ในการแตกตัวเป็นไอออน ทำให้แรงส่งผ่านอิเล็กตรอนและเพิ่มค่าต่างศักย์รีดอกซ์ ดังนั้นแม้ว่าค่าที่ได้ทั้งสองวิธีจะมีค่าในทิศทางเดียวกัน แต่ค่าจากวิธี FRAP ต่ำกว่าวิธี TEAC เสมอ และค่าที่ได้จากวิธี FRAP ส่วนใหญ่จะไม่สัมพันธ์กับค่าที่หาได้จากวิธีอื่น

ถึงแม้ว่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กมีความสัมพันธ์กับการขจัดอนุมูลโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่มาก แต่มีอนุมูลที่ถูกออกซิไดซ์หรือถูกรีดิวซ์ให้เป็นไอออนเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังนั้นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยวิธี FRAP ซึ่งแสดงถึงสภาวะรีดิวซ์ของพลาสมา เนื่องจากวิธี FRAP เป็นวิธีวิเคราะห์โดยหลักการ SET เท่านั้น ดังนั้นการนำผลการวิเคราะห์โดยวิธีอื่นๆมาประกอบ จะทำให้ได้ค่าการประเมินผลที่มีความถูกต้องดีขึ้น

4) วิธี $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนวิธีอื่นๆ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำได้โดยใช้เครื่องมือ EPR หรือเครื่องสเปคโตรวัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm



ภาพที่ 2.7 แสดงกลไกการต้านอนุมูล DPPH

ต่อมามีการพัฒนาใช้ DPPH ในการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เรียกว่า Antiradical Efficiency (AE) โดยคำนวณจากสมการ

$$AE = {}^{1}\!/_{EC_{50}T_{EC_{50}}}$$

EC_{50} = ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดปริมาณ DPPH• เริ่มต้นลงได้ 50 %

T_{EC50}= เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลได้ EC_{50}

ข้อดีของวิธีนี้คือง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรตินอยด์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกัน ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูลนี้มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาต่ออนุมูลที่เกิดขึ้นในร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูง นอกจากนี้โครงสร้างเคมีของ DPPH• ที่แสดงให้เห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระถูกบดบังโดยอนุมูลของเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรเจน ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาขจัดสารอนุมูลอิสระหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริงทั้งๆ ที่สารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH• จางลงได้อีกด้วย

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อาเมต และคณะ (Ahmet ozdemir et al. 2010 : 79-83) ได้ศึกษาอนุพันธ์ของ Hydrazone ต้านเชื้อรา ด้วยเทคนิคทางคลินิก ซึ่งมีความสำคัญต่อการเพิ่มฤทธิ์ของยาต้านเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค โดยมีการวิจัยทางด้านการต้านเชื้อราเพิ่มเติม และมีเป้าหมายในการพัฒนาสารต้านเชื้อราเพิ่มมากขึ้น เช่น สาร N-(1-benzyl-2-phenylbutylidene)-N-[4-(aryl)thiazol-2-yl]hydrazone และ N-(1-benzyl-2-phenylbutylidene)-N-[4-(aryl)thiazol-2-yl]hydrazone

ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์และประเมินผลในการยับยั้งเชื้อราของกลุ่มทดลองที่เป็นกลุ่มมาตรฐานและผู้ป่วยจาก *Candida albicans, Candida glabrata, Candida utilis, Candida tropicalis, Candida krusei, Candida zeylanoides* และ *Candida parapsilosis* อัลเมท และอะแลจิมิ (Almahy, Hassan A. and Alagimi, Awatif A. 2012 : 241-244) ทำการศึกษาสาร Coumarins จากรากของ *Cleme viscose* (L:) เพื่อศึกษาการต้านแบคทีเรียและความเป็นพิษของสารคูมาริน 2 ชนิดคือ 7-Geranyloxycoumarin (auraptene) และ 6-Hydroxy-B-cycloauraptene ที่แยกได้จากรากของ *Cleme viscose* (*Capparidaceae*) ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้คือ *Bacillus cereus* NRRLUI-1447 และ *Pseudomonas aeruginosa* UI-60690 และเชื้อรา 4 ชนิด คือ *Aspergillus ochraceus* NRRL 398, *Candida lipolytica* ATCC 2075, *Sacchromyces cereviseae* NRRL 2034 และ *Sacchromyces lipolytica* การทดสอบความป็นพิษของสารต่อ CEM-SS(T-cell lymphoblastic leukemia) มีค่าที่ IC_{50} ของ 14 และ 18 μg/ml ตามลำดับ Lopez *et al.* ได้แสดงให้เห็นถึงสมบัติทางชีวภาพของ lipophilic *O*-napthoquinone ซึ่งเป็น quinine ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมีฤทธิ์เป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น antibacterial, antifungal, trypanocidal และ cytotoxic effects โดยสมาชิกที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้คือ β-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho [1,2b] pyran-5,6-dione) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น Yoshida and walker sarcoma, epidermoid laryngeal carcinoma, melanoma, promyelocytic-leukemia, prostate, breast, ovary, colon, hepatoma และ lung cancer cells

แอสมี บาท และฮาดี (Azmi, A.S., Bhat, S.H. and Hadi, S.M. 2005 : 3131-3135) ได้แสดงให้เห็นว่า Resveratrol (3,4',5-trihydroxy stilbene) ซึ่งเป็นสารพวก Polyphenol ที่ได้จากพืชต่างๆ เช่น Mulberries, Grapes และ Red wine มีสมบัติทาง Chemopreventive properties, Anti-inflammatory, Anti-platelet, Anti-mutagenic effects และยังมีสมบัติเป็น Agonist สำหรับ Estrogen receptor นอกจากนี้ยังป้องกันโรคหัวใจ (Cardiovascular protective properties) และป้องกันพืชไม่ให้เกิดโรคจากเชื้อรา ขัดขวาง DNA polymerase และ ribonucleotide reductase, ยับยั้ง LDL oxidation ต่อต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ระยะคือ Tumor initiator, Promotion และ Progression ดังนั้น Resveratrol สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้ นักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ยังได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มPolyphenol ที่ได้จากพืช เช่น Flavonoids, Tannins และ Curcumins พบว่ามันสามารถชักนำให้เกิด oxidative DNA damage แม้ว่าจะใช้เพียงลำพัง หรือในรูป Metal compounds เช่น Cu(II) สมบัติหลายประการของสารเหล่านี้ เช่น เกาะกับ DNA และการทำลาย (degradation) คล้ายคลึงกับสารต้านมะเร็งอื่นๆ เช่น Bleomycin, Adriamycin และ 4'-(9-Acridinylamino) methanesulphone-m-anisidine (mAMSA) โดย Polyphenolic resveratrol สามารถทำให้สาย DNA แตกเมื่อมี Cu ไอออนอยู่ด้วย

ไดซิลเวสโทร และคณะ (DiSilvestro, Robert A., et al. 2005 : 251-255) ศึกษาผลการต้านอนุมูลอิสระของ soy isoflavone อาจจะช่วยป้องกันการเกิดซ้ำของมะเร็งเต้านมได้ แต่ isoflavone ที่ออกฤทธิ์คล้าย estrogen อาจจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม การออกฤทธิ์เช่นนี้ของ isoflavone เป็นผลมาจากเอนไซม์ 2 ชนิดที่มี copper อยู่คือ superoxide dismutase 1 (SOD 1; ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระจึงป้องกันโรคมะเร็งเต้านมได้) และ ceruloplasmin (เพิ่มการผลิต estrogen เมื่อมีมากจึงเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม) จากการศึกษาทางระบาดวิทยาของสตรีเอเชียถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดมะเร็งเต้านมและอาหารที่มีถั่ว พบว่าผู้หญิงเซี่ยงไฮ้ที่มี isoflavone จากปัสสาวะปริมาณที่น้อยในสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสตรีที่บริโภคถั่วปริมาณน้อยมีโอกาสเกิดโรคมะเร็ง

แอลไฮซา, มอสโตฟา และเอลคาดี (Al-Haiza, Mostafa, M.A. and El-kady, M.Y. 2003 : 275-286) ใช้ Coumarins เป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่สำคัญในการใช้ประโยชน์ เช่น ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericides), ฆ่าเชื้อรา (fungicides), ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory), Anticoagulant และ Anticancer agents สมบัติทางเภสัชวิทยาเหล่านี้ทำให้นักวิจัยสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ๆ ที่มีมากยิ่งขึ้นไปอีก โดยมีลักษณะที่แตกต่างกันที่วง Heterocyclic ที่เชื่อมต่ออยู่กับ Coumarin (coumarin moiety)

โคสโตวา และคณะ (Kostova, Irena et al. 2005 : 542-551) ทำการสังเคราะห์สารประกอบของ Lanthanum (III) กับ bis-coumarins ศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ด้วยเทคนิค EA, IR, ^{1}H-และ ^{13}C-NMR และ Mass-spectral data ตามลำดับ โดยสเปกตรัมของสารประกอบเหล่านี้เทียบกับลิแกนด์อิสระ พบว่า La(III) ทำปฏิกิริยากับลิแกนด์ที่ตำแหน่ง Deprotonated hydroxyl ทั้ง 2 หมู่ สำหรับ Cytotoxicity ใช้เทคนิค MTT assay กับ HL-60, BV-173 และ SKW-3 cell lines ผลที่ได้คาดว่าสารประกอบเหล่านี้เป็นตัวทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Trigger programmed cell death หรือ apoptosis)

ลีวิส (Lewis, Anne. et al. 2004 : 4550-4558) ได้ศึกษาอนุพันธ์ของคูมาริน (Coumarin) dicumarol (3,3'-Methylene bis [4-hydroxycoumarin] เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก Sweet clover (*Melilotus alba*) ใช้เป็นยา anticoagulant นอกจากนี้สารคูมาริน และอนุพันธ์ยังใช้เป็นยาต้านมะเร็ง โดยเฉพาะต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ malignant cell lines (*in vitro)* นอกจากนี้ยังได้ทดสอบทางคลินิก (Clinical trials) พบว่า สามารถออกฤทธิ์ต้าน Prostate cancer, malignant melanoma และ Metastatic renal cell carcinoma ได้ด้วย

รินฤดี โซ่มงคล ดวงทิพย์ มูลมั่งมี และ สมพร มูลมั่งมี (2549 : 1-8) ได้ศึกษาฤทธิ์การเป็นแอนติออกซิแดนท์และการกำจัดอนุมูลอิสระของโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดกินได้ 5 ชนิด การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยของเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลวโดยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน จะแยกส่วนของเส้นใยเห็ดออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมาทำการตกตะกอนโพลีแซคคาไรด์ด้วยเอทานอล นำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นสารแอนติออกซิแดนท์และ

การกำจัดอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 Thiocyanate method พบว่า โพลีแซคคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ *Hericium erinaceus* รองลงมาคือ *Lentinus squarrosulus* Mont., *Lentinus polychrous* Lev., *Boletus* sp.และ *Schizophyllum commune* BUB-1 ตามลำดับ วิธีที่ 2 DPPH scavenging activity ใช้ความเข้มข้นของโพลีแซคคาไรด์ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า *Boletus* sp. มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ *Schizophyllum commune* BUB-1, *Lentinus polychrous* Lev., *Lentinus squarrosulus* Mont. และ *Hericium erinaceus* ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐาน Buthylatehydroxytoluene (BHT) และ Buthylate hydroxyanisole (BHA) ที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์มากกว่าโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดทั้ง 5 ชนิด วิธีที่ 3 Superoxide radical scavenging activity พบว่า *Schizophyllum commune* BUB-1 และ *Hericium erinaceus* สามารถยับยั้งการเกิด Superoxide radical ได้

นฤมล น้อยหวอย และ ศศิธร จันทนวรางกูร (2550 : 1-8) ได้ศึกษาผลกระทบของการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันในบัวบก จากการศึกษาตัวอย่างบัวบกอบแห้ง, น้ำชาบัวบก, น้ำบัวบกพาสเจอร์ไรส์ และบัวบกผงชงดื่ม พบว่า เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Total phenol assay , 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay และ 2,2'-azino-bis (3- ethylbenzo-6-thiazoline-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity assay พบว่าบัวบกอบแห้งมีคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมา คือ บัวบกทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง, บัวบกทำแห้งแบบพ่นฝอย, น้ำชาบัวบก และน้ำบัวบกพาสเจอร์ไรส์ ตามลำดับ และเมื่อวัดคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay พบว่าน้ำชามีคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันทั้งหมดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือบัวบกทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง, บัวบกทำแห้งแบบพ่นฝอย และน้ำบัวบกพาสเจอร์ไรส์ ตามลำดับและเมื่อสกัดแยกส่วนที่เป็น Hydrophilic และ Lipophilic ในตัวอย่างบัวบกทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และบัวบกอบแห้งพบว่าส่วนใหญ่สารสกัด hydrophilic มีคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัด Lipophilic ของบัวบก

สินีนาฏ อักโขสุวรรณ และศศิธร (2550 : 1-8) ได้ศึกษาผลของการทำแห้งต่อ C-Phycocyanin และสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*) พบว่าการทำแห้งมีผลต่อปริมาณ C-Phycocyanin บริสุทธิ์ และชนิดหยาบ รวมทั้งสมบัติการต้านออกซิเดชัน เมื่อเปรียบเทียบสาหร่ายเกลียวทองที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีต่างๆ กับสาหร่ายเกลียวทองทางการค้า พบว่าสาหร่ายเกลียวทองที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็งและแบบพ่นฝอยมีปริมาณ C-Phycocyanin บริสุทธิ์ และชนิดหยาบสูงสุด และจากการศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยการศึกษาสมบัติการให้อิเลคตรอนโดยวิธี Total phenol และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenly-1-picrylhydrazyl (DPPH) และอนุมูลอิสระ

2, 2–azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) พบว่า สาหร่ายเกลียวทองที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและการทำแห้งแบบแช่แข็งมีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้การทำให้ C-Phycocyanin บริสุทธิ์ของสาหร่ายเกลียวทองที่ผ่านการทำแห้งวิธีต่างๆ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 50% (w/v) พบว่ามี Purity Ratio ($A_{620/280}$) เพิ่มขึ้น 2-5 เท่าจากสารสกัดเริ่มต้น

วริพัสย์ อารีกุล และ นราพร พรหมไกรวร (2550 : 1-10) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบ คาทิชินและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ของชาเบ็ญจขันธ์ในระหว่างกระบวนการผลิต จากการวิเคราะห์ปริมาณคาทิชินด้วยวิธี HPLC และความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ferric reducing antioxidant capacity (FRAP), Folin Ciocalteu reagent (FCR) และ DPPH scavenging assay พบว่า ขั้นตอนการหมักและการทำแห้งมีผลต่อการลดลงของปริมาณคาทิชิน และความสามารถในการต้านออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ขั้นตอนการคั่วมีผลต่อการเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ($p<0.05$) การเพิ่มระยะเวลาการหมักจาก 0 เป็น 190 นาที มีผลทำให้ปริมาณคาทิชินทั้งหมดและความสามารถในการต้านออกซิเดชันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทำแห้งที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียสที่ระดับความเร็วลม 0-0.6 เมตรต่อวินาที พบว่าอุณหภูมิและความเร็วลมมีผลต่อการลดลงของปริมาณคาทิชินทั้งหมดและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กระบวนการผลิตในแต่ละขั้นตอนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาทิชินและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของชาเบ็ญจขันธ์

วิรัชญา จันพายเพชร และ อรสา สุริยาพันธ์ (2551 : 1-8) ได้ประเมินสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวันที่สกัดด้วย เอทานอล หรือ เมทานอล อัตราส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวันต่อแอลกอฮอล์ คือ 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร สกัดที่ 30 ± 1°C นาน 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์การจับอนุมูลไฮดรอกซิล (OH) และ DPPH พบว่า ความสามารถในการจับอนุมูล OH ของสารสกัด (ด้วยเอทานอล หรือ เมทานอล) ขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของสารสกัด (50-1,000 ppm) และที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวันด้วยเมทานอล มีสมบัติในการจับอนุมูล OH สูงกว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวันด้วย เอทานอล ($p<0.05$) ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับ DPPH พบว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวันด้วยเมทานอล และเอทานอล มีค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) เท่ากับ 421.12 และ 202.12 มิลลิโมล TroloxTM /กก. ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวันด้วยเมทานอล (2000 หรือ 3000 ppm) มาใช้ในระบบอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (น้ำมันเมล็ดทานตะวัน 20%) พบว่า มีผลในการชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันเมล็ดทานตะวันเมื่อเก็บที่สภาวะเร่ง (60±1°ซ, 12 วัน) ได้ไม่แตกต่างกับการใช้ Butylated hydroxytoluene 75 ppm ($p<0.05$)

พงศธร ล้อสุวรรณ และคณะ (2551 : 1-8) ได้ทำการศึกษาสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านจุลินทรีย์ของเปลือกผลไม้ จากการศึกษาผลไม้ 8 ชนิด ได้แก่ มังคุด มะม่วง กล้วยหอม ทุเรียน ลองกอง มะละกอ ส้ม และสับปะรด พบว่าเปลือกมังคุด และเปลือกมะม่วงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenly-1-picrylhydrazyl(DPPH) และอนุมูลอิสระ 2, 2'–azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) สูงกว่าเปลือกผลไม้ชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกมังคุดยังมีสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างเปลือกผลไม้ที่ทำการศึกษา เมื่อทดสอบสมบัติการต้านจุลินทรีย์ พบว่า เปลือกมังคุดและเปลือกมะม่วงมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์สูงกว่าเปลือกผลไม้ชนิดอื่น และเปลือกผลไม้ที่ได้ทำการทดลองส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ อีกทั้งยังพบว่าเปลือกมังคุดยังมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus flavus*

เอื้องพลอย ใจลังกา และ สุทัศน์ สุระวัง (2552 : 1-8) ได้ทำการศึกษาผลของกระบวนการหมักที่มีต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายชูหมักจากผลหม่อน ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากผลหม่อน มีขั้นตอนการหมัก 2 ขั้นตอน คือ การผลิตแอลกอฮอล์ และการผลิตกรดอะซิติก โดยได้ทำการศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ที่แตกต่างกันที่มีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบฟีโนลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และ แอนโทไซยานิน) พบว่า ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำผลหม่อนที่ผ่านการหมักในขั้นตอนการผลิตแอลกอฮอล์ มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับน้ำผลหม่อนเริ่มต้น และปริมาณแอลกอฮอล์ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขั้นตอนการผลิตกรดอะซิติก น้ำหม่อนที่ผ่านการหมักจะมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณแอนโทไซยานินมีแนวโน้มที่ลดลงหลังผ่านการหมักเป็นเวลา 7 วัน โดยน้ำหม่อนที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้น 9% สามารถผลิตกรดอะซิติกและสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดได้มากที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 1.07±0.01% และ 285.20±6.10mg GAE/100ml ตามลำดับ

เยาวดี รุ่งเรือง และ สุพิชญา จันทะชุม (2552 : 1-8) ได้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอลจากผักเหมียง โดยศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี ABTS DPPH และ FRAP ในผักเหมียง 3 ส่วน ได้แก่ ยอดอ่อน ใบอ่อน และใบแก่ พบว่า ใบแก่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุดคือ มีค่า 14.66 mg/g dw และ พบว่า สารประกอบฟีนอลิกในใบผักเหมียงทั้ง 3 ส่วนไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (26.68±3.15- 33.87±1.89 mg GAE/g dw) การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ใบอ่อนและใบแก่มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีกว่ายอดอ่อน โดยมีค่า EC50 เท่ากับ 51.67±1.19 และ 52.23±1.08 μg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ยอดอ่อนมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูล ABTS และจับกับโลหะได้ดีที่สุด โดยมีค่า

537.79±6.17 and 364.66±5.80 μmol TE/g dw ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดคลอโรฟิลล์จากใบผักเหมียงที่สกัดด้วยเอทานอล จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้

วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข (2554 : 47-55) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวความเข้มข้น 1 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลอยู่ในช่วง 0.233 ± 0.001 ถึง 1.09 ± 0.04 ไมโครกรัม เมื่อคำนวณเป็น Gallic acid และมี ร้อยละการยับยั้งสาร Diphenyl ถึง 2-picrylhydrazyl (DPPH) อยู่ในช่วง 41.01 ± 4.92 ถึง 91.64 ± 1.38 โดยความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวาน 1 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอล อยู่ในช่วง -0.04 ± 0.006 ถึง 1.06 ± 0.009 ไมโครกรัมเมื่อคำนวณเป็น Gallic acid และมี ร้อยละการยับยั้งสาร DPPH อยู่ในช่วง 3.2 ± 3.3 ถึง 90.49 ± 0.27 จากการเปรียบเทียบสรุปได้ว่า (1) สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวมีปริมาณฟีนอลและ ร้อยละการยับยั้งสาร DPPH มากกว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2) ปริมาณสารประกอบฟีนอลสัมพันธ์กับ ร้อยละการยับยั้งสาร DPPH และ (3) สารฟีนอลและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด

เสาวนีย์ เหลืองธนะผล และคณะ (2545 : 146-147) ได้ทำการสกัดสารแอนติออกซิ-เดนท์จากเปลือกเมล็ดมะขามและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอนติออกซิแดนท์จากเปลือกเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica* L.) โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยตัวทำละลายและการสกัดโดยใช้คาร์บอนได-ออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด ผลการสกัดสารแอนติออกซิแดนท์จากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลาย พบว่า เอทานอลมีความสามารถในการสกัดสารแอนติออกซิแดนท์ได้ดีกว่าเอทิลอะซีเตต สำหรับการสกัดสารแอนติออกซิแดนท์โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด พบว่า การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดร่วมกับเอทานอลให้ผลการสกัดที่ดีกว่า แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิหรือความดันที่ใช้ในการสกัดสามารถสกัดสารแอนติออกซิแดนท์ได้น้อยลง และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 10 เมกะปาสคาล และใช้อัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

สุภานันต์ จึงนิจนิรันดร์ พงศกร รามบุตร และสาคริน์ทร์ ไชศรี (2547 : 1-4) ได้ศึกษาการสกัดสารเอพิคาทิชินจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยเทคนิคฟลูอิดไดเซชัน ผลการศึกษาพบว่าความชื้นของเปลือกเมล็ดมะขามมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.47 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักแห้งการสกัดด้วยเครื่องซ็อกเล็ตที่สภาวะสุญญากาศและการสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิห้องสามารถสกัดสาร EC ได้ 407.30 และ 397.55 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ สำหรับการสกัดด้วยเทคนิคฟลูอิดไดเซชัน พบว่า เมื่อลดขนาดอนุภาคของเปลือกเมล็ดมะขามบดและเพิ่มอัตราการไหลของเอทานอลจะทำให้สามารถสกัดสาร EC ได้มากขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่า

การสกัดโดยการแช่เปลือกเมล็ดมะขามในเอทานอล 1 ชั่วโมงก่อนการฟลูอิดไดซ์จะสามารถสกัดสาร EC ได้ในปริมาณที่สูงกว่าการสกัดโดยการฟลูอิดไดซ์อย่างเดียวถึง 1.28 เท่า

จินดาวัลย์ วิบูลย์อุทัย (2549) ได้ศึกษาผลการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ต่อการอักเสบ และอะพอพโตซีสในแมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามประเมินจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และการยับยั้งการตายของเซลล์แบบอะพอพ-โตซีส ภายหลังการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วย 50% อะซิโตนได้ปริมาณสารสกัดร้อยละ 45.8 ของน้ำหนักแห้ง โดยมีสารประกอบฟีนอลิกเทียบเท่าน้ำหนักกรดแกลิค 178±3.8 มิลลิกรัมต่อกรัม และมีคุณสมบัติซึ่งแปรผันตามปริมาณสารในการต้านอนุมูลอิสระและการรีดักชั่นสูงกว่าวิตามินซี และสารสกัดจากเมล็ดองุ่น เมื่อประเมินโดยวิธีทดสอบ DPPH และ FRAP สารสกัดยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงถึงร้อยละ 60 ในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดสามารถลดระดับการแสดงออกของเอมไซม์ iNOS และ COX-2 และลดการเกิดอะพอพโตซีสของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยอีโทโพไซด์ได้ร้อยละ 10 เมื่อประเมินโดยวิธี Annexin-V-PI เมื่อป้อนสารสกัดที่ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในหนูเมาส์ ICR พบว่าสารสกัดช่วยบรรเทาความเจ็บปวดโดยลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อหน้า และลดความเจ็บปวดร้อยละ 50 เมื่อทดสอบด้วยวิธีม้วนหางหนีความร้อน ดังนั้น สารสกัดจึงมีผลทั้งต่อระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย โดยรวม การศึกษาชี้ชัดว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติซึ่งมีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ควรค่าต่อการพัฒนาให้เป็นยาธรรมชาติเพื่อการป้องกันหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปในอนาคต

เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง และ Hiroshi Shinmoto (2548 : 1-6) ได้ศึกษาการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ณ อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิ และอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ 1,1diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) การลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (Reducing power) และความสามารถจับประจุของอิออนเหล็ก (Ferrous ion chelating ability) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ Trolox พบว่า การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และการลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเมทานอลให้ผลใกล้เคียงกับ Trolox สารที่สกัดโดยใช้เมทานอลและเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถจับประจุของอิออนเหล็กร้อยละ 85.08 และ 82.03 ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดโดยใช้เอทิลอะซีเตตไม่แสดงฤทธิ์ ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH การลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระและความสามารถจับประจุของอิออนเหล็ก

สรุป สารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่างๆ นั้น มีประโยชน์ทั้งในการรักษาโรคของมนุษย์ สัตว์ ตลอดจนโรคพืช โดยสารสำคัญที่เรียกว่า Secondary metabolites พืชสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthetic processes) มีมากมายหลายกลุ่ม แต่ละกลุ่มมีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน นอกจากนั้นสารในกลุ่มนี้ยังมีสมบัติทางเคมีที่โดดเด่น คือ การเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing agents) หรือเป็นสารคีเลต (Chelating agents) เพราะสารธรรมชาติมีอิเล็กตรอนพร้อมที่จะใช้ในการทำปฏิกิริยา (Electron efficiency) จึงมีสมบัติที่เด่นมากมายหลายด้าน เช่น การใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การใช้เป็นสารถนอมอาหาร เครื่องสำอาง เครื่องดื่ม เป็นยารักษาโรค ในงานวิจัยนี้ ทีมวิจัยได้นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม Polyphenolic compounds ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและไม่เป็นพิษ มาเป็นส่วนผสมของอาหารไก่เนื้อ

บทที่ 3
สารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แสดงไว้ดังนี้

ตารางที่ 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ	อุปกรณ์และเครื่องมือ
1	Hotplate and magnetic Stirrer
2	Rotary evaporator, Buchi Rotovapor R-124
3	Florence Flask
4	Volumetic Flask
5	Graduated Cylinder
6	Beaker
7	Magnetic bar
8	Pipet
9	Micro Test Tubes with caps
10	ช้อนตักสาร
11	เครื่องชั่ง
12	กระดาษชั่งสาร
13	ขวดก้นกลม
14	ขวดสีชา
15	โถแก้ว
16	ถุงผ้า
17	กระดาษกรองสาร
18	หลอดเก็บตัวอย่างเลือด
19	Microcentrifuge tube 1.5 ml
20	กล่องใส่ Microtube
21	เข็มฉีดยาเบอร์ 24 x 1 นิ้ว
22	กระบอกฉีดยา ขนาด 3 ml
23	หลอดไส้ใส-SYLVANIA-60W-E20

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ	อุปกรณ์และเครื่องมือ
24	หลอดไส้ใส OSRAM 60W .E27
25	ตะปู 1x16 นิ้ว
26	เทปพันสายไฟ NATION 20 เมตร
27	สาย VAF 2x1 ขด 30 เมตร
28	สาย VFF-BCC ½ นิ้ว
29	กาว-S.LON 250 กรัม
30	คีมปอกสายไฟ 6 นิ้ว
31	คีมปากจิ้งจก PROMA 8 นิ้ว
32	บอลวาล์ว PVC ECCO ½ นิ้ว
33	หลอดประหยัดไฟ Standard 11 W day
34	สวิทซ์ลอย AMATA
35	ปลั๊กไฟ
36	ไม้โครงยางพารา 22 มม.x 2.50 ม.
37	ท่อพีวีซี (8.5) ½ นิ้ว
38	ข้อต่อ (13.5) ½ นิ้ว
39	ปลั๊กอุด PVC ½ นิ้ว
40	ขั้วเยอรมัน E-27 กระเบื้อง
41	ฟิวส์ก้ามปู
42	เทปพันสายไฟ NATION 20 เมตร
43	หลอดไส้ฝ้า OSRAM 100W .E27
44	ฟองน้ำ
45	ไม้กวาด
46	ถุงมือยาง
47	ผ้าปิดจมูก
48	สิ่งของและเบ็ดเตล็ด
49	ลวดขาว
50	กุญแจ
51	เบรกกอร์

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

3.2.1 Ethanol ($C_2 H_5 OH$), เคมีกิจ

3.2.2 Acetic acid (CH_3COOH), AR., เคมีกิจ

3.2.3 DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picry-hydrazyl), Sigma-Aldrich

3.2.4 BHA (3-tert-butyl-4-hydroxyanisol), AR, Fluka

3.2.5 Ascorbic acid, Fluka

3.2.6 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, Fluka

3.2.7 Hydrochloric acid, Chemikit Limited partnership, เคมีกิจ

3.2.8 Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich

3.2.9 Brain Heart Infusion agar, HiMedia Laboratories.Limited, Mumbai (Bombay), India

3.2.10 Sodium hydroxide, Ajax Finechem

3.2.11 โปรตีนเคซีน, Ajax Finechem

3.2.12 ข้าวโพด, ร้านมิตรเกษตร

3.2.13 ลูกไก่เนื้อ A, ร้านมิตรเกษตร

3.2.14 วัคซีนป้องกันปอดอักเสบและหลอดลม, ฟาร์มเทพารักษ์

3.2.15 เปลือกหอย, ฟาร์มเทพารักษ์

3.2.16 เบต้าการ์ดฆ่าเชื้อ, ฟาร์มเทพารักษ์

3.2.17 วิตามิน, ฟาร์มเทพารักษ์

3.2.18 น้ำยาฆ่าเชื้อ ZG 150, ศรีเมืองการเกษตร

3.2.19 เมทไธโอนีน, บูรพาฟาร์ม

3.2.20 ไลซีน, ประมวลการเกษตร

3.2.21 ปลาป่น, ร้านปศุสัตว์นำไทย

3.2.22 กากถั่วเหลือง, ร้านปศุสัตว์นำไทย

3.2.23 ไดแคลเซียม, ร้านปศุสัตว์นำไทย

3.2.24 กากน้ำตาล, บูรพาฟาร์ม

3.2.25 P21, บูรพาฟาร์ม

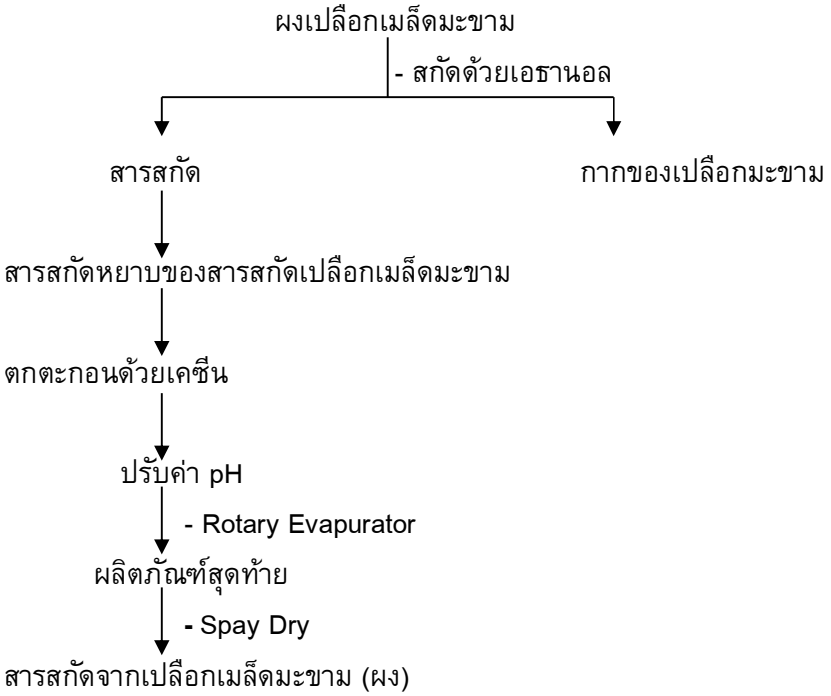
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกเมล็ดมะขาม

นำเมล็ดมะขามมาอบที่อุณหภูมิ 80 ºC นาน 42 ชั่วโมง จากนั้นกะเทาะเปลือกออก นำส่วนที่เป็นเปลือกมาบดให้เป็นผงละเอียด นำผงเปลือกเมล็ดมะขามเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น ก่อนที่จะนำไปสกัด

3.3.1.1 ขั้นตอนการสกัด

1) ทำการชั่งผงเมล็ดมะขาม 1,000 g
2) นำผงเปลือกเมล็ดมะขามทีเตรียมไว้ นำมาใส่โถแก้วที่มีฝาปิดขนาดใหญ่
3) เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 3,000 ml
4) เติมกรด Acetic acid (5 % Acetic acid)
5) หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6) นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมาตกตะกอนด้วยโปรตีนเคซีน
7) ปรับค่า pH ด้วย NaOH ให้ได้ ค่า pH = 6.0 ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง
8) นำไป Rotary Evapurator
9) นำไปทำแห้งด้วยวิธี Spay Dry

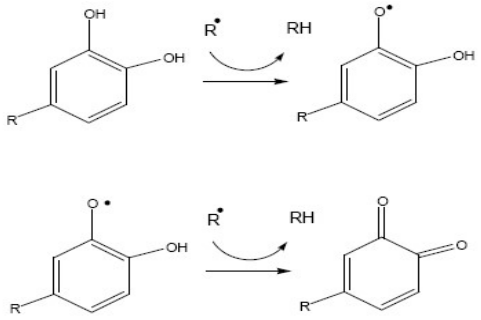


ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล

3.3.2 วิธีการตรวจฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

3.3.2.1 การวัดปริมาณฟีนอลรวม (Folin's method)

สารจำพวกฟีนอล (Phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ สารจำพวก Flavonoids ที่มี Catechol เป็นองค์ประกอบ Stilbenes, Tanninsซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย Aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group โดยมากเป็นสารที่มีขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวก alcohol ได้ดี กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในภาพที่ 2 คือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (Pietta, 2000) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้



ภาพที่ 3.2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอล

1) เตรียมสารละลาย Folin ciocaltue reagent เข้มข้น 0.2 M โดยปิเปต Folin ciocaltue reagent เข้มข้น 2 M 10 ml ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

2) เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 75 g/l โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

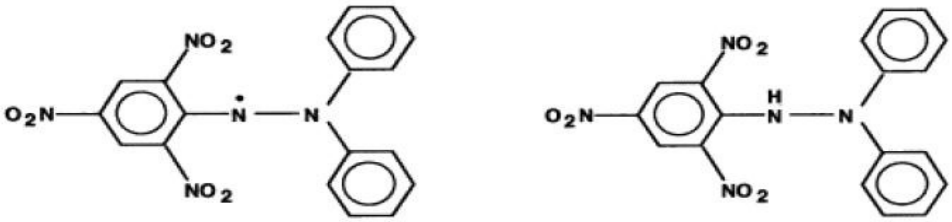
3) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 μg/ ml โดยชั่ง 0.0100 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-100 μg/ml

4) เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม เข้มข้น 50 μg/ml โดยชั่งสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 0.0050 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

5) ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด 0.5 ml เติม Folin reagent 2.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2.0 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชัวโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

3.3.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (Scavenging effect on 1,1-Diphynyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH)) DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 3 (ก) และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 3 (ข)



(ก) Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) (ข) Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

ภาพที่ 3.3 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH

ดังนั้นความสามารถของของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรขณะอยู่ในสารละลาย (นิยมใช้ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระมาก เพราะใช้งานง่าย) โดยในการทดสอบนี้จะให้ DPPH (มีสีม่วงเข้ม) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีจางลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH ทำได้หัวข้อต่อไปนี้

3.3.2.3 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วย DPPH

1) เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 mM โดยการชั่ง DPPH 0.0040 g ละลายในเอทานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Trolox หรือ Ascorbic acid) หรือสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 100 μg/ml โดยชั่งสาร

มาตรฐานหรือสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 0.0100 g ละลายด้วยเอทานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-100 μg/ml

3) ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างมา 0.5 ml และปิเปตสารละลาย DPPH มา 0.5 ml จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดทิ้งไว้ 3 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm (ใช้อัตราส่วนระหว่าง สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างกับ สารละลาย DPPH ในอัตราส่วน 1 : 1)

4) นำไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (%Inhibition) ตามสมการที่ (1)

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{OD_{blank} - OD_{sample}}{OD_{blank}} \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

เมื่อ OD_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายซึ่งไม่ได้เติมสารมาตรฐานหรือสารสกัด

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายซึ่งเติมสารมาตรฐานหรือสารสกัด

3.3.2.4 การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^+$

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเทคนิค ABTS เป็นการศึกษาความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระของ ABTS ที่เกิดขึ้นจากการที่ ABTS ถูกออกซิไดซ์ด้วย Oxidizing agent โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วย วิธี $ABTS^+$

1) เตรียม ABTS ให้อยู่ในรูปของ $ABTS^{+\cdot}$ โดยใช้ ABTS 7.0 mM ผสมกับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) เข้มข้น 2.45 mM ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ได้

2) เตรียมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 1000 μg/ml โดยชั่งสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 0.1000 g ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml นำไปเจือจางที่ความเข้มข้นในช่วง 100-1000 μg/ml

3) ปิเปต $ABTS^{+\cdot}$ มา 1ml และปิเปต สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 33 μl เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 414 nm

4) นำไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% Inhibition) ตามสมการที่ (1)

3.3.2.5 การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay)

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค FRAP เป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ อะตอมของเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+}-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วย วิธี FRAP

1) เตรียมอะซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 300 mM pH 3.6 โดย ชั่งโซเดียมอะซิเตรต ($C_2H_3NaO_2$) 3.1 g เติมกรดอะซิติก 10 ml ปรับ pH ด้วยกรดอะซิติก ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml

2) สารละลาย TPTZ ชั่ง 3.1234 g โดยเติมกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 40 mM ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml

3) เตรียมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 mM โดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริก 9.5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml

4) เตรียมเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น 20 mM ชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ 5.406 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

5) เตรียม FRAP รีเอเจนท์ โดยนำอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 25 ml ผสมกับสารละลาย TPTZ 2.5 ml และเฟอร์ริกคลอไรด์ 2.5 ml

6. เตรียมสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟตเข้มข้น 1000 mM โดยชั่ง เฟอรัสซัลเฟต 0.0278 g ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml นำไปเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 100-1000 mM

7) เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 50 μg/ml โดยทำการเจือจางจาก Stock solution 1000 μg/ml มา 1.25 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 25 ml

8) ปิเปต FRAP รีเอเจนท์ 1 ml เติม สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 33 ml เขย่าให้เข้ากันนาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

3.3.2.6 การแบ่งกลุ่มการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) ซึ่งแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว (ดังแผนภาพ)

แบ่งกลุ่มการทดลองได้ดังนี้

1) กลุ่มทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุมได้รับอาหารตามปกติตลอดการทดลอง

2) กลุ่มทดลองที่ 2 กลุ่มที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 100 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้กินอาหารแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง

3) กลุ่มทดลองที่ 3 กลุ่มที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 200 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้กินอาหารแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง

4) กลุ่มทดลองที่ 4 กลุ่มที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 300 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้กินอาหารแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง

5) กลุ่มทดลองที่ 5 กลุ่มที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 400 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้กินอาหารแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง

6) กลุ่มทดลองที่ 6 กลุ่มที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 500 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้กินอาหารแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง

T4R2	T1R1	T1R3	T5R3	T4R1	T5R2
T6R2	T2R3	T3R1	T6R1	T1R2	T2R1
T6R3	T5R1	T3R2	T4R3	T3R3	T2R2

ภาพที่ 3.4 แผนผังหน่วยการทดลอง

หมายเหตุ

T = สิ่งที่ทดลอง

R = จำนวนซ้ำ

T1 = กลุ่มควบคุม

T2 = กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 100 มิลลิกรัม

T3 = กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 200 มิลลิกรัม

T4 = กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 300 มิลลิกรัม

T5 = กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 400 มิลลิกรัม

T6 = กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม 500 มิลลิกรัม

3.3.2.7 ประสิทธิภาพการผลิต

1) ปริมาณการกินได้ (Feed intake; FI)

ทำการชั่งน้ำหนักอาหารที่ให้และอาหารที่เหลือจากการกินของไก่เนื้อทุกสัปดาห์ เพื่อคำนวณหาปริมาณการกินได้ของไก่เนื้อ

$$\text{ปริมาณการกินได้} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง} \times \text{จำนวนไก่}}$$

2) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily gain; ADG)

ทำการชั่งน้ำหนักของไก่เนื้อทุกสัปดาห์เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน} = \frac{\text{น้ำหนักตัวไก่เนื้อที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง} \times \text{จำนวนไก่}}$$

3) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed conversion ratio; FCR)

ทำการชั่งน้ำหนักอาหารที่ให้และน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของไก่เนื้อทุกสัปดาห์เพื่อคำนวณหาประสิทธิภาพการใช้อาหาร

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น}}$$

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้เก็บรวบรวมข้อมูลที่สำคัญในด้านต่าง ๆ จากการทดลองดังนี้

4.1.1 การสกัดโพลีฟีนอลจากเปลือกเมล็ดมะขาม

4.1.2 การวัดปริมาณฟีนอลรวม (Folin's method)

4.1.3 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH

4.1.4 การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{+}$

4.1.5 การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค FRAP

4.1.6 การแบ่งกลุ่มการทดลอง

4.1.7 ประสิทธิภาพการผลิต

4.2 การสกัดโพลีฟีนอลจากเปลือกเมล็ดมะขาม

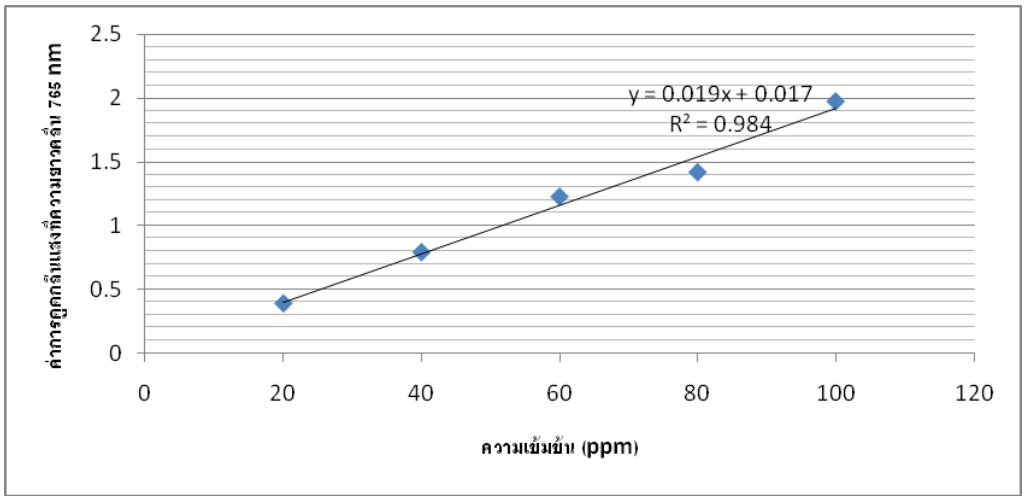
เมล็ดมะขาม 1 kg เมื่อนำไปสกัดด้วยแอลกอฮอล์และตกตะกอนสารโพลีฟีนอลโมเลกุลใหญ่ออกไปด้วยโปรตีนเคซีนแล้วได้สารโพลีฟีนอลที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลงและไม่เป็นพิษ 200 g จากนั้นนำสารสกัดนี้ไปทดสอบสมบัติทางชีวภาพต่างๆ และนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารไก่ตามผลการทดลองในหัวข้อถัดไป

4.3 การหาปริมาณฟีนอลรวม (Folin ciocaltev sphenol reagent)

สารละลายมาตรฐาน Gallic acid และปริมาณฟีนอลรวมเป็นดังตารางที่ 4.1, 4.2 และกราฟที่ 4.1 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในการหาปริมาณฟีนอลรวม

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm
Gallic acid	100	1.976
	80	1.419
	60	1.227
	40	0.790
	20	0.387



กราฟที่ 4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของ Phenolic content

เมื่อนำค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐานจะทำให้ทราบปริมาณฟีนอลรวมดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการหาปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่า Absorbance (765 nm)			Phenolic content (ppm)			$\bar{x}$±SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	100	0.390	0.360	0.334	19.594	18.015	16.647	18.085±1.475
	80	0.312	0.287	0.429	15.489	14.173	21.647	17.103±3.990
	60	0.308	0.243	0.238	15.278	11.857	11.594	12.910±2.055
	40	0.168	0.198	0.174	7.910	9.489	8.226	8.542±0.835
	20	0.117	0.117	0.117	5.226	5.226	5.226	5.226±0.000

จากตารางที่ 4.2 พบว่า ปริมาณฟีนอลรวมแปรตามความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยเมื่อสารตัวอย่างเข้มข้นมากขึ้นปริมาณฟีนอลรวมจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

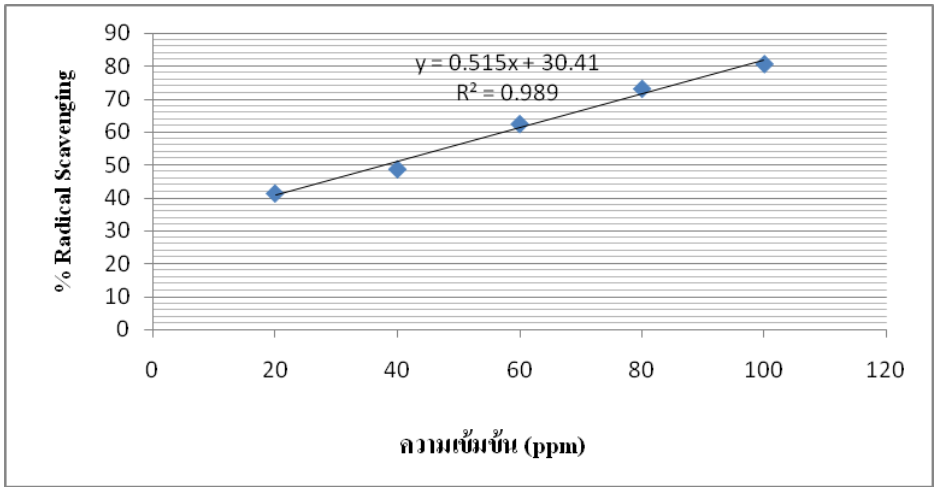
4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแต่ละชนิด

4.4.1 ผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเทคนิค DPPH

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 520 nm			$\bar{x}$±SD	Radical Scavenging activity (%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	100	0.123	0.101	0.100	0.108±0.013	80.174
	80	0.140	0.153	0.158	0.158±0.009	73.214
	60	0.210	0.225	0.197	0.210±0.014	62.500
	40	0.278	0.298	0.287	0.287±0.010	48.750
	20	0.329	0.331	0.325	0.328±0.003	41.428

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดเปลือกมะขามมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น



กราฟที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical Scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

จากกราฟที่ 4.2 นำมาคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^+$ ลดลง 50 % ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ

สารตัวอย่าง	**IC_{50}**
สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	19.59
BHT	22.31
Ascorbic acid	52.76

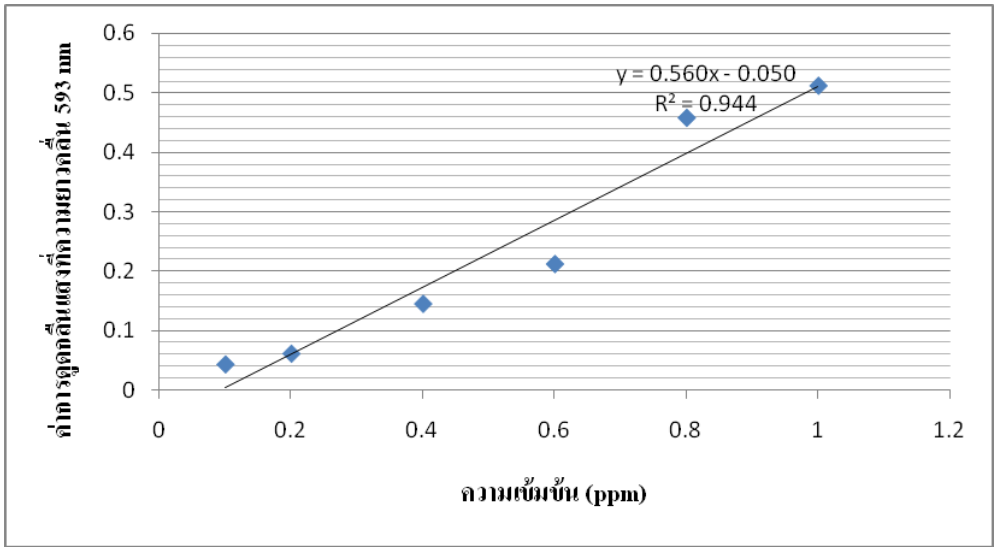
จากตารางที่ 4.3 และ กราฟที่ 4.2 จะเห็นว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT และ วิตามินซี

4. 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

เมื่อนำสารละลาย Iron (II) sulphate ที่เตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 100, 80, 60, 40 และ 20 ppm ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงดังตาราที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการศึกษา **Standard concentration** สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

Standard concentration (ppm)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm**
0.0	0.000
0.1	0.043
0.2	0.061
0.4	0.145
0.6	0.212
0.8	0.458
1.0	0.512



กราฟที่ 4.3 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐานและคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่เกิดขึ้นได้ผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยสารตัวอย่างในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			$\bar{x} \pm SD$	ปริมาณของ Fe^{2+}
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	100	0.381	0.502	0.406	0.429 ± 0.045	0.864
	80	0.378	0.310	0.305	0.331 ±0.029	0.680
	60	0.278	0.254	0.248	0.260 ±0.014	0.547
	40	0.212	0.218	0.221	0.217 ±0.003	0.466
	20	0.250	0.183	0.174	0.202 ±0.029	0.438

จากตารางที่ 4.6 พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้และมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค FRAP แปรตามความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น

4.5 การตรวจหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเทคนิค ABTS เป็นการศึกษาความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระของ ABTS ที่เกิดขึ้นจากการที่ ABTS ถูกออกซิไดซ์ด้วย Oxidizing agent โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ เป็นดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดของมะขามด้วยเทคนิค ABTS

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (414 nm)			$\bar{x}\pm$SD	Radical Scavenging activity (%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Ascorbic acid	100	0.223	0.082	0.056	0.120±0.063	90.468
	80	0.779	0.967	0.476	0.740±0.175	41.223
	60	1.281	0.759	0.766	0.935±0.211	25.734
	40	1.212	0.810	0.795	0.939±0.167	25.416
	20	0.799	1.191	0.835	0.941±0.153	25.258
สารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	100	0.672	0.571	0.595	0.612±0.037	51.389
	80	0.729	0.607	0.614	0.650±0.048	48.371
	60	1.077	0.648	0.687	0.804±0.167	36.139
	40	0.714	1.017	1.298	1.009±0.206	19.857
	20	1.213	0.840	1.326	1.126±0.180	10.563

จากตารางที่ 4.7 พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS ได้และแปรตามค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น (Concentration dependent activity)

จากผลการศึกษา (ตารางที่ 4.8) ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อ พบว่า ปริมาณการกินได้ทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน พบว่า กลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ระดับ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่เสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ระดับ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ประสิทธิภาพการใช้อาหาร พบว่า กลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุดกว่าทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปอร์เซ็นต์ซาก พบว่า เปอร์เซ็นต์ซากทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน และเปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้อง พบว่า กลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ระดับ 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีเปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้องต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่เสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ระดับ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

4.6 ผลการถ่ายทอดเทคนิคการเลี้ยงไก่เนื้อสู่ชุมชน

เมื่อทำการทดลอง เก็บข้อมูล ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแน่นอนทั้งเทคนิค In vitro และ In vivo แล้วทีมวิจัยได้ทำการถ่ายทอดเทคนิคการเลี้ยงไก่ด้วยสารสกัดเมล็ดเปลือกมะขามให้กับเกษตรกรเลี้ยงไก่ บ้านหนองเหล็ก ตำบลถลุงเหล็ก อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์

ภาพที่ 4.1 การถ่ายทอดความรู้เทคนิคการเลี้ยงไก่เนื้อด้วยสมุนไพรให้กับตัวแทนชาวบ้าน

4.7 อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบความสามารถหรือออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT และ วิตามิน ซี นอกจากนี้สารตัวอย่างยังออกฤทธิ์ในลักษณะของ Concentration dependent activities ทุกเทคนิคที่ศึกษาในครั้งนี้

เมื่อทำการเลี้ยงไก่เนื้อที่มีการเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามในสูตรอาหารที่ระดับความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 100, 200, 300, 400, 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 42 วัน ทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิต ปริมาณการกินได้ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ประสิทธิภาพการใช้อาหาร เปอร์เซ็นต์ซาก เปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้อง และได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) และระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในวันที่ 14, 28 และ 42 วันของการทดลองผลการศึกษา พบว่า ปริมาณการกินได้ทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน แต่น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ในกลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามที่ระดับ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เสริมสารสกัดเมล็ดมะขามที่ระดับ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหาร ซึ่งในกลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนเปอร์เซ็นต์ซากทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าเปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้องของไก่เนื้อในกลุ่มที่ทำการเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามที่ระดับ 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีเปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้องต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่า การเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามทำให้น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันและประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงขึ้น รวมถึงทำให้ปริมาณไขมันในช่องท้องของไก่เนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ ปวีณา ชารีลินทร์ และคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาระดับของสารต้านอนุมูลอิสระที่เหมาะสมจากเปลือกเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อ พบว่า การเสริมสารโพลีฟีนอลจากเปลือกเมล็ดมะขามที่ระดับ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงกว่าทุกกลุ่มการทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองของ Chowhury, S.R. และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการเสริมสารสกัดจากเมล็ดมะขามบดในการเลี้ยงไก่ไข่ พบว่า ผลผลิตของไก่ไข่ การกินได้ และน้ำหนักของไข่แดงมีค่าเพิ่มสูงขึ้น Pumthong, G. (1999) รายงานว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีลักษณะโครงสร้างเหมือนสารโอลิโกเมอริกโปรแอนโทไซยานิดิน (oligomeric proanthocyanidins, OPC) ซึ่งเป็นสารใน

กลุ่มแทนนินอัดแน่น มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงมาก ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์จากการเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อ พบว่า ในวันที่ 14, 28 และ 42 วันของการทดลอง ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ทุกกลุ่มทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับการทดลองของ วีณาพร จันทะสินธุ์ (2543) ได้ทำการศึกษาสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมาของหนูทดลอง พบว่า การป้อนสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในหนูทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมาของหนูทดลอง

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการเลี้ยงไก่เนื้อ พบว่า ในวันที่ 14 ของการทดลอง กลุ่มควบคุมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ในวันที่ 28 และ 42 ของการทดลอง พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทุกกลุ่มทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน จากประสิทธิภาพการผลิตที่เพิ่มขึ้นสูงขึ้น เมื่อไก่มีปริมาณน้ำหนักตัว การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันและประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงขึ้น จำเป็นต้องมีกระบวนการเผาผลาญพลังงานเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย วรพล เองวานิช (2550 : 294-301) รายงานว่า การเผาผลาญพลังงานหรือกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายโดยใช้ออกซิเจนจะเกิดอนุมูลอิสระขึ้นเสมอ เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายจะช่วยยับยั้งให้อยู่ในสภาวะสมดุล ดังนั้นจากผลการทดลองในวันที่ 14 ของการทดลอง ในกลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดเมล็ดมะขาม ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ากลุ่มควบคุม เนื่องจากมีกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายเพิ่มขึ้นจากประสิทธิภาพการผลิตที่เพิ่มขึ้นสูงขึ้นนั้นเอง หลังจากนั้นร่างกายก็จะปรับสภาพเข้าสู่สภาวะสมดุล ทำให้วันที่ 28 และ 42 ของการทดลองความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทุกกลุ่มทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ ณัฐฐาพร ดาลัย (2549) ได้ทำการศึกษาสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในหนูเพศผู้อายุ 7 สัปดาห์ พบว่า การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางชีวเคมีในหนู ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับกลูตาไธโอนและการเหนี่ยวนำ Glutathion S-tranferase activity แสดงให้เห็นว่า การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำระบบการต้านอนุมูลอิสระในหนู

ตารางที่ 4.8 การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อสมรรถนะการผลิตและซากในไก่เนื้อ

สิ่งทดลอง	การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในสูตรอาหารไก่เนื้อ (mean±SD)					
	กลุ่มควบคลุม	100 mg/kg diet	200 mg/kg diet	300 mg/kg diet	400 mg/kg diet	500 mg/kg diet
ปริมาณการกินได้ (กรัม/ตัว/วัน)	108.87±5.22	98.41±10.80	104.92±3.85	109.29±5.99	105.32±3.29	102.23±12.29
น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	1952.03±45.04^{c}	2040.99±47.70^{ab}	2084.75±51.83^{ab}	2108.94±18.64^{a}	2009.90±3.50^{bc}	2000.99±72.01^{bc}
อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (กรัม/ตัว/วัน)	46.48±1.07^{c}	48.59±1.13^{ab}	49.64±1.23^{ab}	50.21±0.44^{a}	47.86±0.08^{bc}	47.64±1.71^{bc}
ประสิทธิภาพการใช้อาหาร	2.34±0.07^{a}	2.19±0.07^{b}	2.08±0.02^{c}	2.25±0.02^{ab}	2.28±0.08^{ab}	2.33±0.03^{a}
เปอร์เซ็นต์ซาก	79.70±2.03	79.89±1.01	80.19±1.86	80.53±0.57	79.96±2.41	80.83±0.14
เปอร์เซ็นต์ไขมันในช่องท้อง	2.22±0.10^{a}	1.87±0.07^{b}	1.39±0.07^{de}	1.57±0.11^{de}	1.64±0.23^{cd}	1.80±0.02^{bc}

หมายเหตุ - ^{abcde} อักษรบนค่าเฉลี่ยที่ต่างกันในแนวนอนเดียวกัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.9 การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในการเลี้ยงไก่เนื้อ

สิ่งทดลอง	การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในสูตรอาหารไก่เนื้อ (mean±SD)					
	กลุ่มควบคลุม	100 mg/kg diet	200 mg/kg diet	300 mg/kg diet	400 mg/kg diet	500 mg/kg diet
วันที่ 14	3.17±0.76	4.37±1.69	4.41±1.92	5.22±0.82	5.00±2.18	4.43±1.90
วันที่ 28	3.74±0.64	4.05±0.82	3.81±0.45	4.19±0.31	3.82±1.00	3.83±1.31
วันที่ 42	3.54±1.53	4.81±3.05	3.78±0.45	4.26±0.68	4.37±1.99	3.87±0.97
เฉลี่ย	3.93±0.61	5.12±0.27	4.68±0.84	5.71±2.16	5.06±1.70	3.59±0.61

หมายเหตุ - ^{abc} อักษรบนค่าเฉลี่ยที่ต่างกันในแนวนอนเดียวกัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

จากผลการศึกษา (ตารางที่ 4.9) ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในการเลี้ยงไก่เนื้อ พบว่า ในวันที่ 14, 28 และ 42 วันของการทดลอง ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ทุกกลุ่มทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.10 การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการเลี้ยงไก่เนื้อ

สิ่งทดลอง	การเสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในสูตรอาหารไก่เนื้อ (mean±SD)					
	กลุ่มควบคลุม	100 mg/kg diet	200 mg/kg diet	300 mg/kg diet	400 mg/kg diet	500 mg/kg diet
วันที่ 14	1.13 ± 0.02^{a}	1.10 ± 0.12^{ab}	0.99 ± 0.06^{bc}	1.09 ± 0.09^{ab}	1.00 ± 0.12^{abc}	0.96 ± 0.03^{c}
วันที่ 28	0.86±0.06	0.87±0.02	0.92±0.10	0.85±0.07	0.82±0.01	0.87±0.11
วันที่ 42	1.05±0.15	1.05±0.05	1.03±0.12	1.09±0.44	0.99±0.21	0.95±0.21
เฉลี่ย	1.01±0.14	0.97±0.14	0.97±0.06	1.01±0.14	0.94±0.10	0.93±0.05

หมายเหตุ - ^{abc} อักษรบนค่าเฉลี่ยที่ต่างกันในแนวนอนเดียวกัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

จากผลการศึกษา (ตารางที่ 4.10) ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการเลี้ยงไก่เนื้อ พบว่า ในวันที่ 14 ของการทดลอง กลุ่มควบคุมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่เสริมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ระดับ 100, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ส่วนในวันที่ 28 และ 42 ของการทดลอง พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทุกกลุ่มทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน

บทที่ 5
สรุป วิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 บทนำ

ในบทนี้คณะผู้วิจัยได้สรุปประเด็นต่างๆ ที่ได้จากการทำวิจัย ได้แก่ phenolic content ที่มีในสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายแอลกอฮอล์ สมบัติทางชีวภาพ (biological activities) ในด้านการต้านอนุมูลอิสระเทคนิค DPPH, FRAP, $ABTS^{+}$ การนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามไปเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงไก่เนื้อและถ่ายทอดความรู้สู่ชุมชน

5.2 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้เป็นการนำเปลือกเมล็ดมะขามมาทำการสกัดสารสำคัญโพลีฟีนอลโดยตัวทำละลายแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซนต์ เปลือกเมล็ดมะขาม 1 kg เมื่อนำไปสกัดด้วยแอลกอฮอล์และตกตะกอนสารโพลีฟีนอลโมเลกุลใหญ่ออกไปด้วยโปรตีนเคซีนแล้วได้สารโพลีฟีนอลที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลงและไม่เป็นพิษจำนวน 200 g

หาปริมาณฟีนอลรวม พบว่า ปริมาณฟีนอลรวมแปรตามความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยเมื่อสารตัวอย่างเข้มข้นมากขึ้นปริมาณฟีนอลรวมจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก ดังต่อไปนี้ คือ 5.226, 8.542, 12.910, 17.103, 18.085 ppm ตามลำดับ

ศึกษาสมบัติทางชีวภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยวิธี DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picry-hydrazyl) พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ที่ค่า IC_{50} ที่ต่ำเท่ากับ 19.59 ppm จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน BHT และ วิตามินซี พบว่า ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 22.31, 52.76 ppm ตามลำดับ ซึ่งจะพบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT และ วิตามินซี

ศึกษาสมบัติทางชีวภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay) พบว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้และมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค FRAP แปรตามความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นซึ่งได้ค่าปริมาณ Fe^{2+} จากความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก ดังนี้ คือ 0.438, 0.466, 0.547, 0.680, 0.864 ppm ตามลำดับ

ศึกษาสมบัติทางชีวภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยวิธี $ABTS^{+}$ พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS ได้และแปรตามค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ซึ่งได้ค่าเปอร์เซนต์ Radical Scavenging activity จากความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก ดังนี้ คือ 10.563, 19.857, 36.139, 48.371, 51.389 ตามลำดับ และจากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี พบว่า ได้ค่าเปอร์เซนต์ Radical Scavenging activity จากความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก ดังนี้ คือ 25.258, 25.416, 25.734, 41.223, 90.468 จะพบว่า สารมาตรฐานวิตามินซีสามารถขจัดอนุมูลอิสระของ ABTS ได้ดีกว่าสารโพลีฟีนอลจากเปลือกเมล็ดมะขาม

การเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อ ทำให้มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันและประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงขึ้น รวมถึงทำให้ปริมาณไขมันในช่องท้องของไก่เนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งระดับที่เหมาะสมในการเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อ คือ ที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตไก่เนื้อดีที่สุด แต่การเสริมสารสกัดเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อไม่มีผลต่อระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในไก่เนื้อ

หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ถ่ายทอดความรู้เทคนิคการเลี้ยงไก่เนื้อด้วยสมุนไพรสู่กลุ่มตัวแทนเกษตรกรบ้านหนองเหล็ก ตำบลถลุงเหล็ก อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ โดยการเลี้ยงไก่เนื้อด้วยสมุนไพรจากเปลือกเมล็ดมะขาม จะช่วยเร่งให้ไก่มีการเจริญเติบโตที่ดี ช่วยลดไขมันในช่องท้องของไก่เนื้อ ลดต้นทุนในการผลิต ลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เพิ่มความต้านทานต่อโรค สามารถนำไปใช้ในการเลี้ยงไก่ในระดับครัวเรือนทั้งยังสามารถขยายไปในระดับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

5.3.1.1 ควรมีการนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามทดลองใช้กับสัตว์เศรฐกิจชนิดอื่นๆ เช่น หมู ซึ่งเมื่อนำไปใช้กับหมูในปัญหาของไขมันในกล้ามเนื้อซึ่งสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามอาจช่วยลดชั้นไขมันของหมูซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตและขายได้ราคาดียิ่งขึ้น

5.3.1.2 ควรมีการพัฒนาสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่รู้จักและผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5.3.2 ข้อเสนอแนะสำหรับการนำผลการวิจัยไปใช้

5.3.2.1 เกษตรกรที่เลี้ยงไก่สามารถนำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามไปเป็นส่วนประกอบของอาหารไก่

5.3.2.2 เป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรมองเห็นคุณค่าของสมุนไพรใกล้ตัว และนอกจากนี้ยังเป็นการสนับสนุนให้เกษตรกรร่วมกันปลูกและอนุรักษ์พันธุ์มะขามเปรี้ยวในท้องถิ่นของตนเอง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จินดาวัลย์ วิบูลย์อุทัย. (2549). **ผลการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ต่อการอักเสบ และอะพอพโตซีสในแมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม**. ดุษฎีนิพนธ์ วท.ด. (ชีววิทยาสิ่งแวดล้อม). นครราชสีมา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ณัฐฐาพร ดาลัย. (2549). **ผลของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในตับหนูขาว**. รายงานการศึกษาปัญหาพิเศษ วท.ม. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นฤมล น้อยหวอย และศศิธร จันทนวรางกูร. (2550). **ผลกระทบของการแปรรูปต่อคุณสมบัติการ ต้านออกซิเดชันในบัวบก**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์-การอาหาร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปวีณา ชาลีรินทร์ และคณะ. (2552). **การศึกษาระดับของสารต้านอนุมูลอิสระทีเหมาะสมจากเปลือกเมล็ดมะขามในการเลี้ยงไก่เนื้อ**. รายงานการศึกษาปัญหาพิเศษ วท.บ. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

พงศธร ล้อสุวรรณ และคณะ. (2551). **สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของเปลือกผลไม้**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เยาวดี รุ่งเรือง และ สุพิชญา จันทะชุม. (2552). **กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอลจากผักเหมียง**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยี-อาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รวีวรรณ โสธะโร. (2531). คุณค่าทางอาหารและอิทธิพลการใช้สีของสาหร่ายเส้นด้าย และแกลบกุ้งในอาหารไก่กระทงและไก่ไข่. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สัตวบาล). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รินฤดี โซ่มงคล ดวงทิพย์ มูลมั่งมี และ สมพร มูลมั่งมี. (2549). **การศึกษาฤทธิ์การเป็นแอนติออกซิแดนท์และการกำจัดอนุมูลอิสระของโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดกินได้**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วรพล เองวานิช. (2550). “กลไกลกาสร้างและการทำลายอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน.” **ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม**. 26(3): 294-301.

วริพัสย์ อารีกุล และ นราพร พรหมไกรวร. (2550). **การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบคาทิชินและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของชาเบ็ญจขันธ์ในระหว่างกระบวนการผลิต**. กรุงเทพฯ : โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. (2554). “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว.” **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**. 16(1) : 47-55.

วิรัชญา จันพายเพ็ชร และ อรสา สุริยาพันธ์. (2551). **การประเมินสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวัน**. ชลบุรี : ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีณาพร จันทะสินธุ์. (2543). **ผลของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามต่อระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ใน พลาสมาหนูขาวใหญ่ที่ถูกป้อนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์**. รายงานการศึกษาปัญหาพิเศษ วท.ม. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สินีนาฏ อักโขสุวรรณ และศศิธร จันทนวรางกูร. (2550). **ผลของการทำแห้งต่อ C-Phycocyanin และสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*)**. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภานันต์ จึงนิจนิรันดร์ พงศกร รามบุตร และสาครินทร์ ไชศรี. (2547). **การสกัดสารเอพิคาทิชินจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยเทคนิค ฟลูอิดไดเซชัน**. วิทยานิพนธ์ วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เสาวนีย์ เหลืองธนะผล และคณะ. (2545). **การสกัดสารแอนติออกซิแดนท์จากเปลือกเมล็ดมะขาม**. วิทยานิพนธ์ วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง และ Hiroshi Shinmoto. (2548). **การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลาย**. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุมูลอิสระของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดทานตะวัน. ชลบุรี : ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอื้องพลอย ใจลังกา และ สุทัศน์ สุระวัง. (2552). **ผลของกระบวนการหมักที่มีต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายชูหมักจากผลหม่อน**. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. เชียงใหม่ : ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Ahmet, Ozdemir et al. (2010). "Synthesis of some novel hydrazone derivatives and evaluation of their antituberculosis activity." **Marmara Pharmaceutical Journal**. 14 : 79-83.

Al-Haiza, Mostafa, M.A. and El-kady, M.Y. (2003). "Synthesis and Biological Evaluation of Some New Coumarin Derivatives." **Molecules**. 8 : 275-286.

Almahy, Hassan A. and Alagimi, Awatif A. (2012. April). "Coumarins from the roots of *Cleme Viscosa* (L.) antimicrobial and cytotoxic studies." Arabian Journal of chemistry. 5(2) : 241-244.

Azmi, A.S., Bhat, S.H. and Hadi, S.M. (2005). "Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties." **FEBS Letters**. 579: 3131-3135.

Chowdhury, S.R. and M.A. Wahid. "Effect of Dietary Tamarind on Cholesterol Metabolism in Laying Hens," Poult. Sci. 84(4) : 56-60, 2005

DiSilvestro, Robert A., et al. (2005). "Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors." **Breast Cancer Research and Treatment**. 89 : 251-255.

Kostova, Irena et al. (2005). "Cytotoxic activity of new lanthanum (III) complexes of bis-coumarins." **European Journal of Medicinal Chemistry**. 40 : 542-551.

Lewis, Anne. *et al.* (2004). "Treatment of Pancreatic Cancer Cells with Dicumarol Induces Cytotoxivity and Oxidative Stress." **Clinical Cancer Research**. 10(1) : 4550-4558.

Lin, Hai, Eddy Decuypere and Johan Buyse. (2006). "A cute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens." **Comparative Biochemistry and physiology-Part A: Molecular & Integrative physiology**, 144(1): 11-17.

Pumthong, G. (1999). **Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds Extracted from Seed Coat of Tamarindus indica Linn**. Chiang Mai : Chiang Mai University, Thailand.

Sahin, K. et al. (2002). "Effects of vitamin E and A supplementation on lipid peroxidation and concentration of some mineral in broilers Reared under heat stress (32°c)." **Nutrition Research**. 22 : 723-731.

Tsuda, T., et al. (1995). "Supacritical carbon dioxide extraction of antioxidative componenets from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat." **Journal of Agricultural and food chemistry**. 43 : 2803-2806.