

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในเครื่องดื่มน้ำผลไม้

Determination of Phenolic Compounds and Antioxidant Potential in Fruit Beverages

เนตรนภา เมฆกลาง (Nednapa Moeiklang)^{1*} ดร.เฉลิม เรืองวิริยะชัย (Dr. Chalerm Ruangviriyachai)**

บทคัดย่อ

การวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณและเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้ ด้วยวิธีมาตรฐาน ได้แก่ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) และวิธี 1, 10-Phenanthroline (Phen) จากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่าเครื่องดื่มน้ำสมอไทยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ 2765.00 ± 0.00 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง เครื่องดื่มน้ำมะตูมกลิ่นตะไคร้และใบเตยเท่ากับ 1749.76 ± 0.02 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างและ น้ำองุ่นแดงเท่ากับ 1501.80 ± 0.02 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างตามลำดับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า เครื่องดื่มน้ำสมอไทยมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ 2453.32 ± 0.08 ไมโครกรัมบีเอชทีต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำองุ่นแดงเท่ากับ 2412.64 ± 0.06 ไมโครกรัมบีเอชทีต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างและเครื่องดื่มน้ำมะตูมกลิ่นตะไคร้และใบเตยเท่ากับ 2406.32 ± 0.20 ไมโครกรัมบีเอชทีต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง ตามลำดับและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Phen มากที่สุดคือเครื่องดื่มน้ำสมอไทยมีค่าเท่ากับ 3131.61 ± 0.02 ไมโครกรัมเพอร์สัลเฟตต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง น้ำองุ่นแดงเท่ากับ 2833.97 ± 0.03 ไมโครกรัม เพอร์สัลเฟต ต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง และเครื่องดื่มน้ำมะตูมกลิ่นตะไคร้และใบเตยเท่ากับ 2802.64 ± 0.01 ไมโครกรัมเพอร์สัลเฟตต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง ตามลำดับ

ABSTRACT

This study aimed for determining and comparing of phenolic compounds in various fruit beverages. The Folin-Ciocalteu analysis was used for the standard method of phenolic determination and the antioxidant was evaluated by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) and 1, 10-Phenanthroline (Phen) methods. The results showed that the maximum total phenolic compounds, obtained from anchor thai beverages is 2765.00 ± 0.00 $\mu\text{g gallic/ 1 mL sample}$, whereas those obtained from bael odour lemongrass and pandan indicated 1749.76 ± 0.02 $\mu\text{g gallic/ 1 mL sample}$ and red wine 1501.80 ± 0.02 $\mu\text{g gallic/ 1 mL sample}$,

¹ Correspondent author: nate_chem43@hotmail.com

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสำหรับครู คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

respectively. For antioxidants capacity, it was found that anchor thai beverages yielded maximum of 2453.32 ± 0.08 μg BHT/ 1 mL sample and the red wine 2412.64 ± 0.06 μg BHT/ 1 mL sample and bael odour lemongrass and pandan beverages gave 2406.32 ± 0.20 μg BHT/ 1 mL sample, respectively using DPPH method. Finally, by using Pnen technique, the highest quantity was anchor thai beverages 3131.61 ± 0.02 μg of ferrous sulphate/1 mL sample and red wine 2833.97 ± 0.03 μg of ferrous sulphate/1 mL sample and bael odour lemongrass and pandan 2802.64 ± 0.01 μg of ferrous sulphate/1 mL sample, respectively

คำสำคัญ : เครื่องดื่มน้ำผลไม้ สารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

Key Words : Fruit berverage, Phenolic compounds, Antioxidant

บทนำ

ความหมายของน้ำผลไม้ [1]

น้ำผลไม้ (fruit Juice) หมายถึง น้ำซึ่งมาจากการคั้นหรือสกัดจากผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำองุ่น (grape juice) น้ำส้ม (orange juice) น้ำแอปเปิล (apple juice) น้ำสับปะรด (pineapple juice) และน้ำมะม่วง (mango juice) เป็นต้น ประเภทของน้ำผลไม้

1. น้ำผลไม้พร้อมดื่ม เป็นชนิดที่สามารถดื่มได้ทันที ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำผลไม้ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้ที่นำมาเป็นวัตถุดิบและวิธีการผลิตของโรงงาน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 ประเภทย่อย คือ

1.1 น้ำผลไม้ 100% (single strenght juice) เช่น น้ำส้ม และน้ำสับปะรด เป็นต้น

1.2 น้ำผลไม้ 25-50% เช่น น้ำฝรั่ง และน้ำมะม่วง ซึ่งไม่สามารถผลิตเป็นน้ำผลไม้พร้อมดื่ม 100 % ได้ ต้องนำมาเจือจางและปรุงแต่งรสชาติก่อน

2. น้ำผลไม้เข้มข้น (concentrated fruit juice) ผลิตจากการนำน้ำผลไม้แท้จากธรรมชาติไประเหยน้ำบางส่วนออกไปเพื่อเพิ่มความเข้มข้น เมื่อนำมาบริโภคต้องนำมาผสมน้ำเพื่อเจือจางเสียก่อน น้ำผลไม้เข้มข้นส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มต่างๆ

3. น้ำผลไม้ปรุงแต่งกลิ่น ผลิตโดยการนำ

ผลไม้ หรือเนื้อผลไม้ประมาณ 25% ขึ้นไป เจือสีสังเคราะห์แล้วทำให้เข้มข้นด้วยน้ำตาล โดยก่อนจะดื่มต้องนำไปผสมน้ำตามอัตราส่วนที่ระบุเพื่อลดความเข้มข้น ทั้งนี้ น้ำผลไม้ประเภทปรุงแต่งกลิ่นของผู้ผลิตแต่ละรายจะมีอัตราส่วนของการทำให้เจือจางแตกต่างกัน

4. น้ำผลไม้สำเร็จรูปชนิดผง เป็นการผลิตโดยการนำน้ำผลไม้มาคั้น ระเหยเอาน้ำออกแล้วปั่นแห้งให้เป็นผง แล้วนำมาบรรจุในถุงซองเพื่อความสะดวกในการบริโภค น้ำผลไม้สำเร็จรูปชนิดผงที่เห็นกันมากที่สุด ได้แก่ ส้ม มะตูม ชิง เป็นต้น

5. เนกต้าผลไม้ (fruit nectar) น้ำผลไม้ที่เติมน้ำ เติมน้ำตาลเข้าไป[2]

6. น้ำเชื่อมผลไม้

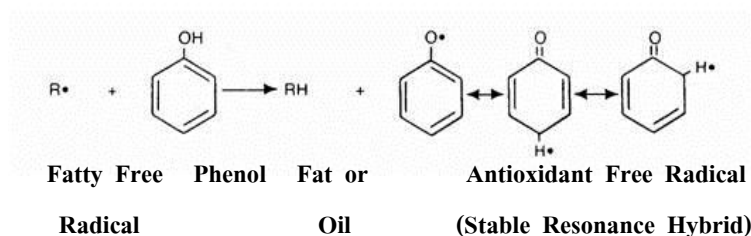
อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicle) คือ โมเลกุลที่ไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีที่มีผลต่อการทำลายโมเลกุลอื่นๆ ต่อเนื่องกันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระจึงเป็นสารพิษต่อเซลล์ของร่างกาย ถ้ามีมากก็เป็นอันตรายได้โดยจะทำลายดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ และอื่นๆ ในระยะสั้นอนุมูลอิสระมีผลต่อการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ ในระยะยาวมีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ ปัจจุบันผลการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศพบว่า

อนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเรื้อรังชนิดไม่ติดต่อหลายชนิด โดยเฉพาะโรคมะเร็งซึ่งเป็นสาเหตุแห่งการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนไทยและคนทั่วโลก [3] อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรคหรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือระบบแอนติออกซิแดนท์ ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสารเหล่านี้จะรวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โพรตีน ไขมันคาร์โบไฮเดรตดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบแอนติออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้น

ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อต่าง ๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตเช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และการทำลายเซลล์ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่นเส้นเลือดตีบโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้นๆ มาก่อน รวมไปถึงโรคมะเร็งเป็นต้น [4]

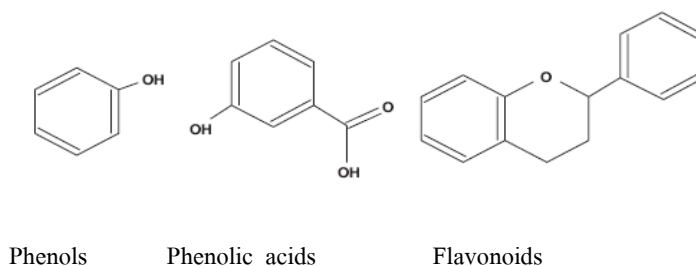
สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้พวกอนุมูลอิสระก่อตัวขึ้น โดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระ ช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย รวมทั้งช่วยกำจัดและแทนที่โมเลกุลที่ถูกทำลาย [3]



ภาพที่ 1 กลไกการต้านออกซิเดชันของสารจำพวกฟีนอลิก [5]

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่พบได้ในพืช ซึ่งปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากพืชผักและผลไม้จะแตกต่างกัน ออกไปตามชนิดของพืช วิธีการปลูก ระดับความสุก กระบวนการแปรรูปและการเก็บ การใช้ความร้อนใน กระบวนการแปรรูปมีส่วนทำให้ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกลดลง และสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่ม หนึ่งที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่เป็นวงแหวนอะโรมาติก และมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ ลิกนิน กรดซินนามิก และโคเอ็นไซม์คิว



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไป [1]

สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิกไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลที่พบในพืช มักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือจะเป็นสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น

ตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ เป็นตัวอย่างที่วางจำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมังคุดผสมน้ำเสารส น้ำเสารสเข้มข้น น้ำส้มผสมน้ำมะขาม น้ำสับประรดผสมน้ำใบโหระพา น้ำสละเข้มข้น น้ำมัลเบอร์รี่น้ำทับทิมเครื่องดื่ม น้ำมะตูมกลิ่นตะไคร้และใบเตย น้ำอุ่นแดงและเครื่องดื่มน้ำสโมไทย โดยสุ่มตัวอย่างจากร้านขายของฝากในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่ผลิตในประเทศไทยและวางจำหน่ายตามท้องตลาดในประเทศไทยว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูล

อิสระมากน้อยเพียงใด ซึ่งในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ได้ระบุส่วนประกอบของผลไม้ในรูปของร้อยละ โดยใช้วิธีมาตรฐานในการตรวจวัด ได้แก่ การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) และ 1,10-Phenanthroline (Phen) โดยอาศัยการตรวจวัดทางสเปกโทรสโกปี ว่าเหมาะสมกับการบริโภคหรือไม่ และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกซื้อเครื่องดื่มน้ำผลไม้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่มีจำหน่ายและผลิตในประเทศไทยจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้แต่ละชนิดที่มีจำหน่ายและผลิตในประเทศไทยจำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

นิทรา [6] ได้ศึกษาสารเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภค โดยเก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม ถึงพฤษภาคม 2548 รวม

24 ตัวอย่าง จาก 11 ผู้จำหน่าย จำแนกเป็นชาเขียว ผสมน้ำผลไม้ จำนวน 9 ตัวอย่าง ชาเขียวใส่นมจำนวน 2 ตัวอย่าง และชาเขียวเปล่าจำนวน 13 ตัวอย่าง นำมาประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay ประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มชาเขียวพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าร้อยละ 80 จำนวน 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 87.5)

นิทรา และคณะ [7] ได้ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นในเครื่องดื่มน้ำผลไม้และสมุนไพรพร้อมบริโภคที่ผลิตและจำหน่ายในประเทศไทย ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2548 ถึงเดือนเมษายน 2549 โดยวิธี DPPH assay เก็บตัวอย่างจากสถานที่ผลิตและจำหน่ายในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ทั้งหมด 184 ตัวอย่าง จำแนกผลิตภัณฑ์ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ เครื่องดื่มชนิดน้ำ เครื่องดื่มชนิดชา และเครื่องดื่มชนิดผง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นพบว่า เครื่องดื่มชนิดน้ำ ร้อยละ 30.1 (28 ตัวอย่างจาก 93 ตัวอย่าง) เครื่องดื่มชนิดชา ร้อยละ 26.8 (15 ตัวอย่างจาก 56 ตัวอย่าง) และเครื่องดื่มชนิดผง ร้อยละ 5.7 (2 ตัวอย่างจาก 35 ตัวอย่าง) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าร้อยละ 80 ผลไม้และสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงในเครื่องดื่มชนิดน้ำ ได้แก่ องุ่น มะเฟือง มะเฒ่า กวาวเครือแดง เป็นต้น เครื่องดื่มชนิดชาชาชง ได้แก่ ชาอายุ หล้าหนดแมว พลุควา เป็นต้น และเครื่องดื่มชนิดผง ได้แก่ ใบเตย หล้าหนดแมว [2]

วัสดุและวิธีการวิจัย

สารเคมี

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เกรด AR บริษัท Aldrich ประเทศอเมริกา, 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) เกรด AR บริษัท Acros Organics ประเทศอเมริกา, Gallic acid Monohydrate เกรด AR บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์, Methanol

เกรด AR บริษัท Carlo Erba ประเทศไทย, Sodium carbonate anhydrous เกรด AR บริษัท Univar ประเทศออสเตรเลีย, 1,10-Phenanthroline เกรด AR บริษัท RFCL ประเทศอินเดีย และ Folin-Ciocalteu reagent, Ferrous sulphate heptahydrate, Ferric chloride เกรด AR บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

เครื่องมือที่ใช้

เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Model EBA 2 บริษัท Hertich จำกัด จากประเทศเยอรมนี, เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่งรุ่น Sartorius BSA224 จากประเทศเยอรมนี, เครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น 8453 บริษัท Agilent จำกัด จากประเทศอเมริกา

อุปกรณ์อื่น ๆ

Beaker ขนาด 20, 25, 100 มิลลิลิตร, Cuvette ขนาด 1 เซนติเมตร ทำด้วยควอร์ต, Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 5, 10 มิลลิลิตร, Measuring pipet ขนาด 1, 2, 5, 10 มิลลิลิตร, Micropipet ขนาด 100 ไมโครลิตร, ขวดสีชาขนาดเล็ก, ขวดวัดปริมาตร ขนาด 20, 25, 100 มิลลิลิตร การทดลอง

การทดลอง แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนได้แก่ การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ทำการวิเคราะห์ 2 วิธี ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) และการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,10-Phenanthroline (Phen)

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu

นำตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้มาวิเคราะห์ถ้าสารละลายเข้มข้นเกินไปให้เจือจางและนำส่วนในมาวิเคราะห์เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่ต้องการปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสีชาขนาดเล็ก

เติมสารละลาย 10% (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) Folin-Ciocalteu Reagent ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 7.5% Na_2CO_3 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน และตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที (ถ้าสารละลายชุนนำไปปั่นเหวี่ยงและนำเอาสารละลายใสมาวิเคราะห์) เมื่อเกิดปฏิกิริยาสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (A_{765}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิก ในช่วง 50 – 200 ไมโครกรัม

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

scavenging capacity (DPPH)[7]

นำตัวอย่างเครื่องตีม้น้ำผลไม้มาวิเคราะห์ ถ้าสารละลายชุนนำไปปั่นเหวี่ยง และนำส่วนใสมาวิเคราะห์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่ต้องการนำมาปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐาน DPPH ปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ในขวดสีชาขนาดเล็ก เขย่าให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที สีจะอ่อนลง เกิดจากการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (ถ้าสารละลายชุนนำไปปั่นเหวี่ยงและนำส่วนใสมาวิเคราะห์) แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (A_{515}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากกราฟมาตรฐาน BHT ในช่วงความเข้มข้น 10 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1, 10-Phenanthroline (Phen)

[8]

นำตัวอย่างเครื่องตีม้น้ำผลไม้มาวิเคราะห์ ถ้าสารละลายชุนนำไปปั่นเหวี่ยงและนำส่วนใสมาวิเคราะห์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่ต้องการนำมาปริมาตร 0.60 มิลลิลิตรเติม เติมเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น 0.2% (โดยมวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรเติม 1,10-Phenanthroline เข้มข้น 0.5% (โดยมวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไปจากนั้นปรับปริมาตรสารผสมให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอลเขย่าและเก็บสารผสมไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (A_{510}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากกราฟมาตรฐาน เฟอร์รัสซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 50 – 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการวิจัย

ตัวอย่างเครื่องตีม้น้ำผลไม้ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ ตัวอย่างที่ 10 เครื่องตีม้น้ำสมอไทยได้ 2765.00 ± 0.00 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างรองลงมาคือ ตัวอย่างที่ 8 เครื่องตีม้น้ำมะตูมกลั่นตะไคร้และใบเตยได้ 1749.76 ± 0.02 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างและอันดับสาม ตัวอย่างที่ 9 น้ำอุนแดงได้ 1501.80 ± 0.02 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง

ตัวอย่างเครื่องตีม้น้ำผลไม้ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มากที่สุด คือ ตัวอย่างที่ 10 เครื่องตีม้น้ำสมอไทยได้ 2453.32 ± 0.08 ไมโครกรัมบีเอชทีต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างรองลงมาคือ ตัวอย่างที่ 9 น้ำอุนแดงได้ 2412.64 ± 0.06 ไมโครกรัมบีเอชทีต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างและอันดับสาม คือ ตัวอย่างที่ 8 เครื่องตีม้น้ำมะตูมกลั่นตะไคร้และใบเตยได้ 2406.32 ± 0.20 ไมโครกรัมบีเอชทีต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง

ตัวอย่างเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Phen มากที่สุด คือ ตัวอย่างที่ 10 เครื่องดื่ม น้ำสมไทยได้ 3131.61 ± 0.02 ไมโครกรัม เพอร์สซัลเฟตต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง รองลงมาคือ ตัวอย่างที่ 9 น้ำอุนแดงได้ 2833.97 ± 0.03 ไมโครกรัม เพอร์สซัลเฟตต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง และอันดับสาม คือ ตัวอย่างที่ 8 เครื่องดื่ม น้ำมะตูมกลั่นตะไคร้และใบเตยได้ 2802.64 ± 0.01 ไมโครกรัมเพอร์สซัลเฟตต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่ม น้ำผลไม้จากเครื่องดื่ม น้ำผลไม้จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยตรง พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จะสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี Phen ดังนั้นเมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมาก แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็ควรจะมีมากตามไปด้วย

วิธี DPPH นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน อนุมูล DPPH มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์ร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงได้ และนอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่มากบางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้ง ๆ ที่สารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีฤทธิ์ที่ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกไซด์ และสารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH จางลงได้อีกด้วย [9]

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Phenanthroline สามารถวัดได้ด้วย การอาศัยการเปรียบเทียบความสามารถในการรีดิวซ์โลหะได้โดยอาศัยการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ให้ไปเป็นเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) แล้วทำปฏิกิริยากับ 1-10-phenanthroline เกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีแดง ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้นจะแปรผันตามค่าการดูดกลืนแสงที่สามารถแสดงถึงการเป็นตัวรีดิวซ์ หรือการต้านอนุมูลอิสระที่ติดนั่นเอง[8]

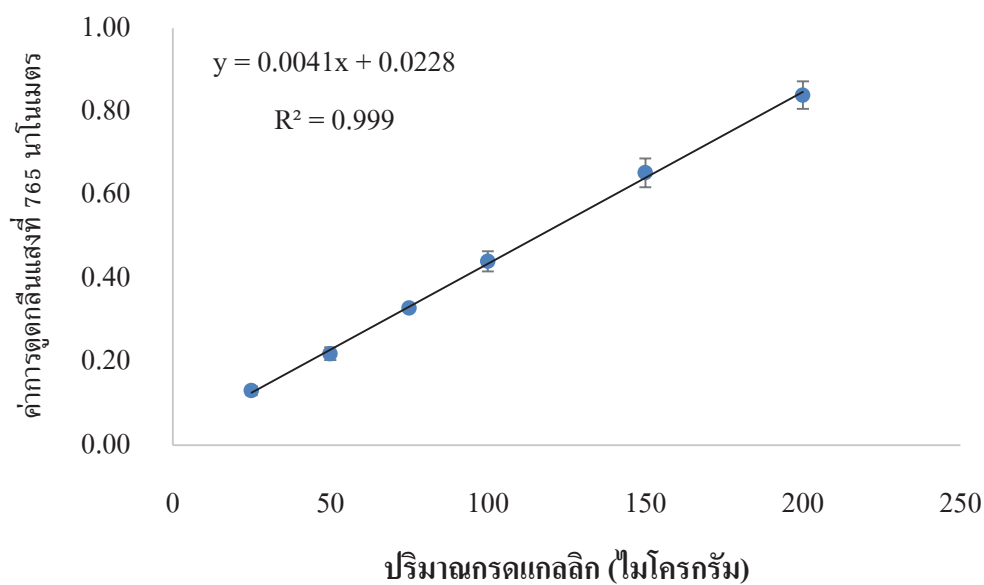
เอกสารอ้างอิง

1. Food Network Solution. Phenolic compounds [Internet]. 2014 [update 2014 Mar 19; cited 2010]. Available from: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound>
2. Institute of Scientific and Technological Research in Thailand, Department of food technology. Drinking fruit juice value. [Internet]. 2014 [update 2014 May 26; cited 2010]. Available from: http://www.tistr-foodprocess.net/fruit/article_fruit/article_fruit1.htm.
3. Photong P. Antioxidants help fight the disease.[Internet]. 2014 [update 2014 May 26; cited 2010]. Available from: [http://www.stou.ac.th/study/sumrit/12-55\(500\)/page2-12-55\(500\).html](http://www.stou.ac.th/study/sumrit/12-55(500)/page2-12-55(500).html).
4. Viratwong P. free radicals /antioxidants. [Internet]. 2014 [update 2014 May 27; cited 2010]. Available from: <http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html>
5. Antioxidant. [Internet]. 2014 [update 2014 Mar 27; cited 2010]. Available from: <http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/0311.htm>.

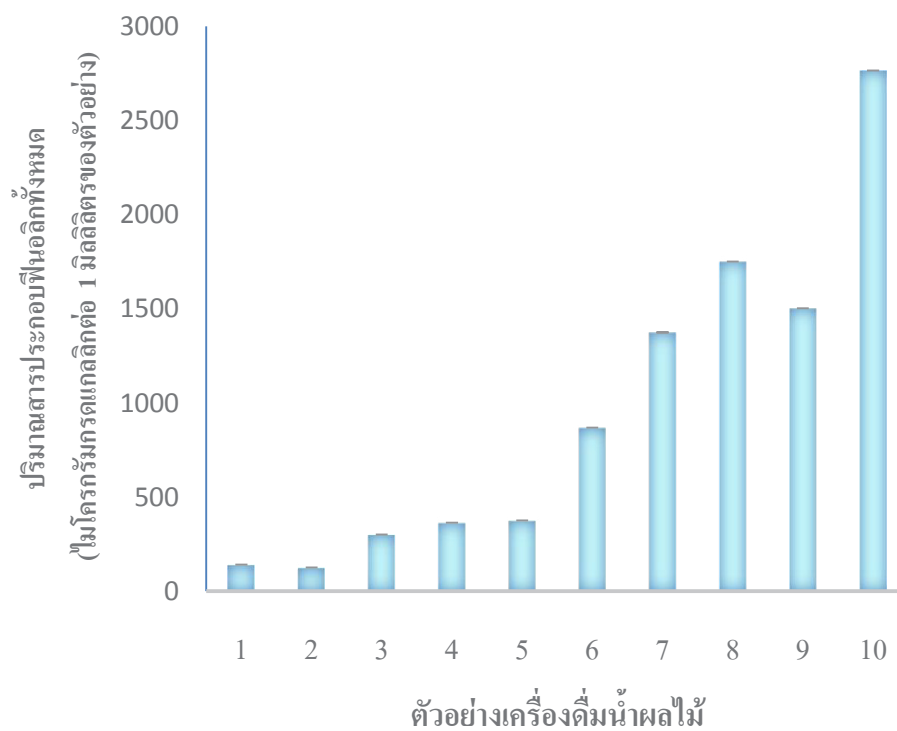
6. Nerngchamnong N. Chemical and antioxidant in green tea products. In J Public Health. 2006;15(2):233-242. Thai.
7. Nerngchamnong N. et al. Preliminary assessment antioxidant drink made from fruit and herbs, Thailand. In J Health. 2008; 16(4): 776-786. Thai.
8. Szydłowska-Czerniak A, Dianoczki C, Recseg K, et al. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. In J Talanta. 2008; 76(4): 899-905.
9. Vacharagup O, Bunjong P, Bunyarat J, Atsinthong M. Antioxidant. Nonthaburi. 2006. Thai.

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด(ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง)ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ไมโครกรัมบีเอชที่ต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Phen (ไมโครกรัมเฟอร์รัสซัลเฟตต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง)

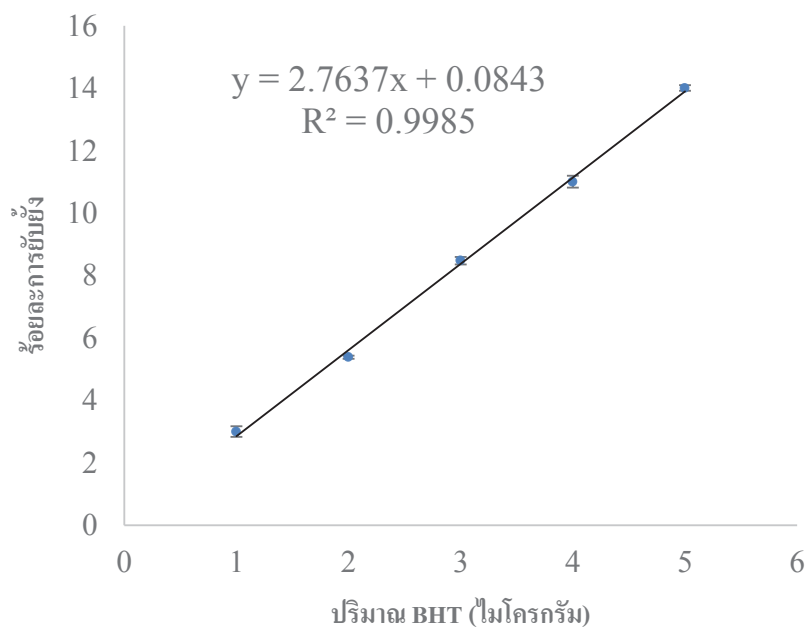
ที่	ตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมกรด แกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่าง)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	
			วิธี DPPH (ไมโครกรัมบีเอช ที่ต่อ 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่าง)	วิธี Phen (ไมโคร กรัมเฟอร์รัสซัลเฟต ต่อ 1 มิลลิลิตรของ ตัวอย่าง)
1	น้ำมั่งคุดผสมน้ำเสาวรส	141.34±0.04	725.78±0.03	1006.23±0.02
2	น้ำเสาวรสเข้มข้น	126.19±0.10	522.84±0.07	936.46±0.04
3	น้ำสมอผสมน้ำมะขาม	301.19±0.15	997.57±0.04	1397.28±0.02
4	น้ำสับปะรดผสมน้ำ ใบโหระพา	363.92±0.02	1056.21±0.02	1432.59±0.04
5	น้ำสละเข้มข้น	374.94±0.04	1338.92±0.12	2542.86±0.01
6	น้ำมัลเบอร์รี่	868.01±0.02	1822.67±0.15	2997.28±0.02
7	น้ำทับทิม	1374.14±0.17	2384.03±0.17	2563.73±0.01
8	เครื่องดื่มน้ำมะตูม กลิ่นตะไคร้และใบเตย	1749.76±0.02	2406.32±0.20	2802.64±0.01
9	น้ำอุนแดง	1501.80±0.02	2412.64±0.06	2833.97±0.03
10	เครื่องดื่มน้ำสมอไทย	2765.00±0.00	2453.32±0.08	3131.61±0.02



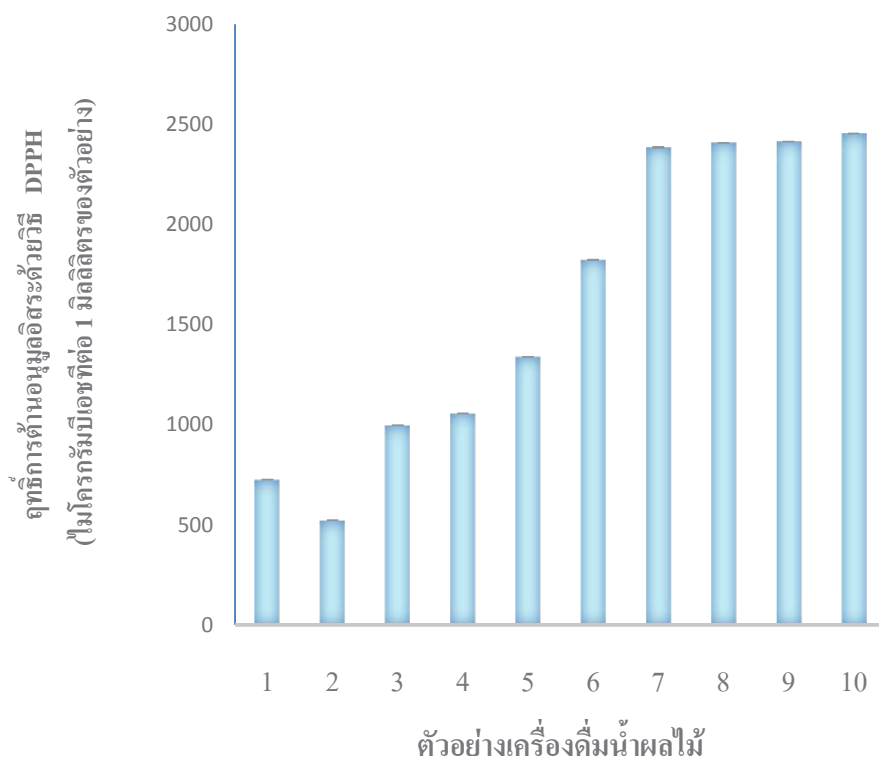
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร กับปริมาณของกรดแกลลิก (ไมโครกรัม)



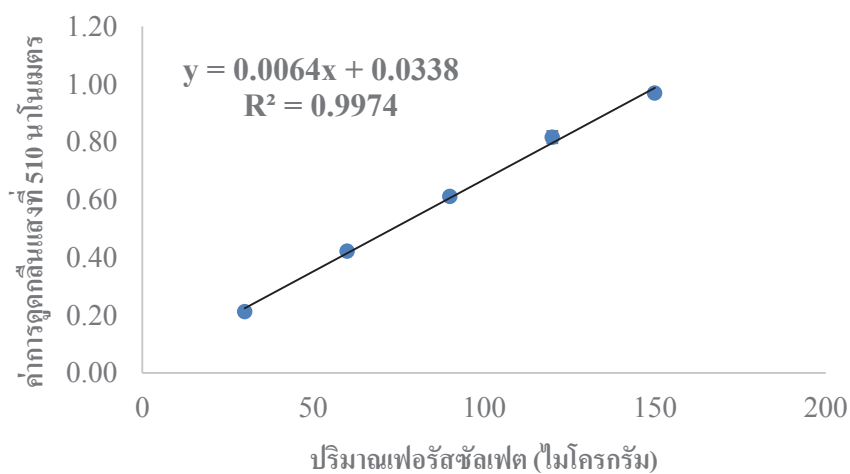
ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบพีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิตรของตัวอย่าง) กับตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้



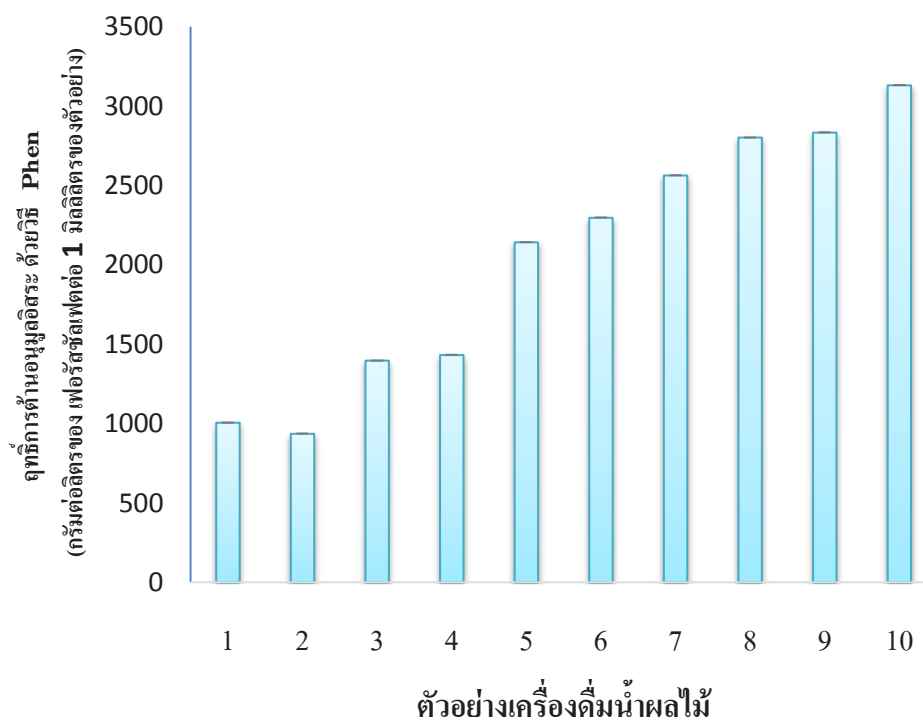
ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งกับปริมาณ BHT (ไมโครกรัม)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ไมโครกรัมบีเอชทีต่อ 1 มิลลิตรของตัวอย่าง)



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร กับปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต (ไมโครกรัม)



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Phosphenol (กรัมต่อลิตรของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง) กับตัวอย่างเครื่องดื่ม น้ำผลไม้