ว.วิทย. มข. 45(4) 844-857 (2560) KKU Sci. J. 45(4) 844-857 (2017)

การสกัดดอกกระเจียวแดงและประเมินกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบสภาวะก่อนและหลังการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหาร

Extraction of *Curcuma sessilis* Gage and Its Antioxidant Determinations Compared between before and after *in vitro* Simulated Digestion

อัญชลี ศรีจำเริญ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

E-mail: anchalee1@gmail.com

บทคัดย่อ

ดอกกระเจียวแดงสายพันธุ์ที่บริโภคจัดเป็นพืชอยู่ในวงศ์เดียวกับขิง ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกกระเจียวแดงซึ่งแยกออกเป็น 3 ส่วนคือ กาบรองดอกสีแดง กาบรองดอกสีเขียว และเหง้า โดยใช้สารสกัด 3 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล อะซีโตน วัตถุประสงค์งานวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสภาวะก่อนและหลังการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารเปรียบเทียบกับขิงและวิตามินอี ผลการศึกษาพบว่าการสกัดดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงด้วยน้ำและเมทานอลทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกปริมาณมากที่สุด สารสกัดจากกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS ดีที่สุด หลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารพบว่า สารสกัดจากกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวออกฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระชนิด hydroxyl radical และทำหน้าที่เป็น Fe^{2+}–chelating agent ได้ดีที่สุด สารสกัดดอกกระเจียวแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับขิง

ABSTRACT

Edible cultivar of *Curcuma sessilis* Gageis in the same family with ginger which has antioxidant activities. The plant was divided into 3 parts: red flower, green flower, and rhizome. All samples were extracted with either water, methanol, or acetone. The objective of this study was to investigate antioxidant activities before and after simulated digestion of the samples compared to ginger and vitamin E. Results showed that the red flower extracted with water or

methanol contained highest amount of phenolic compounds. The red and the green flower extracts were good sources of ABTS antioxidant activity. After *in vitro* simulated digestion, the red and the green flowers were good sources of antioxidants against hydroxyl radical and Fe^{2+}–chelating agents. In summary, *Curcuma sessilis* Gage has antioxidant activities similar to that of ginger.

คำสำคัญ: กระเจียว เหง้า ต้านอนุมูลอิสระ เลียนแบบการย่อยอาหาร สกัด

Keywords: *Curcuma sessilis* Gage, Rhizome, Antioxidant, Simulated digestion, Extraction

1. บทนำ

เมแทบอลิซึมในร่างกายมนุษย์มีปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งเป็นสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหาย อย่างไรก็ตาม การบริโภคอาหารที่มีสารอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในระหว่างการปรุงอาหารหรือกระบวนการแปรรูปอาหาร อาจทำให้ร่างกายมีปริมาณสารอนุมูลอิสระมากเกินความสมดุล ส่งผลต่อการดำเนินลุกลามของโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเบาหวาน หรือ อาการทางจิตเวชและระบบประสาท (Tohma et al., 2016)

สารต้านอนุมูลอิสระพบในพืชเกือบทุกชนิด เนื่องจากเป็น secondary metabolite ของพืช สารต้านอนุมูลอิสระมีจำนวนมากจำแนกเป็นหลายประเภท เช่น แคโรทีนอยด์ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก เป็นต้น สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในพืชแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของพืชและปัจจัยในระหว่างการปลูกพืช เช่น อุณหภูมิ สภาพแวดล้อม มีรายงานวิจัยแสดงว่าพืชที่มีการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิสูง ส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นจากเดิม (Pukalskiene et al., 2015) ประเทศไทยมีพืชท้องถิ่นที่มีคุณค่าทางพฤกษเคมีจำนวนมาก งานวิจัยหลายชิ้นศึกษาวิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการทดสอบในหลอดทดลองเพื่อเลียนแบบปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายมนุษย์ โดยจำแนกวิธีวิเคราะห์ต่าง ๆ ตามหลักการให้โปรตอน หรือ อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ

กระเจียวเป็นพืชไม้ล้มลุกมีลำต้นใต้ดินเป็นพืชที่ออกดอกในฤดูฝน ส่วนที่ทำหน้าที่สะสมอาหารเรียกว่า เหง้าหรือหัวมีดอกที่ยอดของลำต้นเทียม ลักษณะเป็นช่อดอกแน่นเรียงซ้อนกันเป็นแถว (รัฐศักดิ์, 2553) กระเจียวจัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกับ ขิง ข่า ขมิ้นชัน ว่านมหาเมฆ ว่านชักมดลูก มีสาระสำคัญ คือ เคอร์คูมิน (Curcumin) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและงานวิจัยบางชิ้นแสดงผลการทำงานคล้ายวิตามินซีและวิตามินอี มีฤทธิ์ป้องกันการอักเสบ มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มการ apoptosis ของเซลล์ตับที่ผิดปกติ ทำให้ช่วยลดการอักเสบในเซลล์ตับ (Krup et al., 2013) ดอกกระเจียวพบในหลายประเทศมีมากกว่า 60 ชนิด ประเทศไทยพบมากกว่า 34 ชนิด แบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ 1. ดอกกระเจียวสายพันธุ์ไม้ประดับ สายพันธุ์ที่พบมาก คือ ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia Gagnep.*) หรือเรียกว่า สยามทิวลิปแดง (red Siam tulip) พบมากที่อุทยานแห่งชาติป่าหินงาม จังหวัดชัยภูมิ ชาวสวนปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจเพื่อการส่งออกจำหน่ายต่างประเทศในรูปแบบของดอกไม้ประดับ 2. ดอกกระเจียวสายพันธุ์ที่บริโภคเป็นอาหาร พบในป่า

เขตร้อนชื้น ซึ่งในประเทศไทยพบสายพันธุ์กระเจียวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.) มากที่สุด ลักษณะการปรุงอาหารมีการนำดอกอ่อนและหน่ออ่อนมาต้มกับกะทิหรือลวกจนกระทั่งดอกนุ่ม บริโภคพร้อมกับน้ำพริก ลาบ หรือใส่ในแกงเผ็ด ผัดผักต่าง ๆ พบการบริโภคดอกกระเจียวปริมาณมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของดอกกระเจียวสายพันธุ์กระเจียวแดงมีจำนวนน้อย เช่น Wongwattanasathien (2010) รายงานว่าในพืชกระเจียวแดงอาจมีสารประกอบฟินอลิกเป็นองค์ประกอบอย่างน้อยที่สุด 1 ชนิด และอาจจะเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenes เช่น curcumin ซึ่งพบมากในเหง้าขมิ้นชัน หรืออาจจะเป็นสาร Zedoarol ซึ่งพบมากในว่านมหาเมฆ คำถามงานวิจัยครั้งนี้คือควรใช้สารละลายชนิดใดจึงจะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกกระเจียวแดงอยู่ในกลุ่มใด และหลังผ่านกระบวนการเลียนแบบการย่อยอาหารของมนุษย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกกระเจียวแดงยังอยู่ในระดับเดิมหรือไม่ งานวิจัยครั้งนี้ทำการแบ่งส่วนของดอกกระเจียวเป็นสามส่วนตามลักษณะปรากฏ ได้แก่ กาบรองดอก (สีแดง) กาบรองดอกอ่อน (สีเขียว) และ เหง้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกกระเจียวส่วนต่าง ๆ ก่อนและหลังการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหาร เปรียบเทียบผลการวิจัยกับขิงผงซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกัน และใช้วิตามินอี (α - tocopherol) เป็น positive control

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 วัตถุดิบ

ดอกกระเจียวแดงสายพันธุ์รับประทานจากเขตพื้นที่ป่าในเขตอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง จังหวัดพิษณุโลก ซื้อจากพ่อค้าที่มีความเชี่ยวชาญเกี่ยวกับดอกกระเจียวและทำงานร่วมกับเจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง จังหวัดพิษณุโลก ขิงผงผลิตโดยโรงพยาบาลบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก บรรจุในแคปซูล Lot number: GIC 020258 สำหรับเอนไซม์และสารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นชนิดสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louise, MO.)

2.2 การเตรียมตัวอย่างพืชกระเจียวแดง

แยกพืชกระเจียวเป็น 3 ส่วน คือ 1. กาบรองดอกสีแดง 2. กาบรองดอกอ่อน (สีเขียว) และ 3. เหง้า ล้างสะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างทุก ๆ ชั่วโมง จนกว่าค่าความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาบดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นผสม จนสามารถร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช (sieve mesh) บรรจุตัวอย่างผงในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่สภาวะสุญญากาศ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2.3 การสกัดสารออกฤทธิ์

นำผงของพืชกระเจียวทั้งสามส่วน ขิงผง และวิตามินอี มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ที่มีลำดับสภาพขั้วต่ำและสูงแตกต่างกันชัดเจนเพื่อสกัดสารสำคัญได้มากที่สุด ได้แก่ เมทานอล น้ำ อะซิโตน โดยผสมตัวอย่าง 1 ส่วน ต่อสารสกัด 2 ส่วน (w/v) เขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด

ทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกจากส่วนต่าง ๆ ของพืชกระเจียวขิงผง และวิตามินอี โดยใช้คุณสมบัติ reducing property ของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างในการรีดิวซ์สารประกอบใน Folin-Ciocalteu reagent นำสารสกัดปริมาตร 23 มิลลิลิตร เติมสาร Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างดี ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ประเมินค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยของ Gallic Acid Equivalent (GAE) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของตัวอย่าง (Tohma et al., 2016)

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัด

นำตัวอย่าง 1 กรัมผสมในน้ำกลั่นปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วผสมกับ $NaNO_2$ ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย $AlCl_3$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งไว้เป็นเวลา 6 นาที เติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (mol/L) ใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปประเมินค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm รายงานปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในหน่วยของมิลลิกรัมของ Catechin ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของตัวอย่าง (Zhishen et al., 1999)

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน

วิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) มีหลายวิธี ซึ่งมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ในการทดลองนี้เลือกใช้หลายวิธี โดยจัดแบ่งตามลักษณะปฏิกิริยาที่มีการให้อิเล็กตรอน เช่น 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), Ferric reducing antioxidant power (FRAP), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) หรือตามลักษณะกลไกการทำงานในการเป็นสารรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ เช่น reducing power, FRAP หรือ วิธีที่สะท้อนปริมาณสารอนุมูลอิสระด้วยการวิเคราะห์ปริมาณสารอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้น เช่น hydroxyl radical, Fe^{2+} -chelating activity (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005)

2.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี ABTS นำสารละลาย ABTS ทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากตัวอย่างทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาซึ่งจะทำให้สีจางลง นำไปประเมินค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบคำนวณปริมาณ Trolox equivalent antioxidant capacity จากกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ของ Trolox นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ดังสมการ

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

2.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH นำตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับแอลกอฮอล์ 1.5 มิลลิลิตร และสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.375 มิลลิลิตร ตั้งในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที และประเมินค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Li et al., 2012)

2.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP เตรียมสารละลาย acetate buffer ที่มีส่วนผสมของ $C_2H_3NaO_2{\cdot}3H_2O$ 3.1 กรัม ผสม $C_2H_4O_2$ 16 มิลลิลิตร ปรับ pH 3.6 เรียกว่า stock solution เตรียม TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (mM) ในสารละลายผสมของกรด HCl 40 มิลลิโมลาร์ และ $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ 20 มิลลิโมลาร์ เรียกว่า สารละลาย TPTZ ทำการเตรียมสารละลาย FRAP ด้วยการผสมสารละลาย acetate buffer 25 มิลลิลิตร และสารละลาย TPTZ 2.5 มิลลิลิตร และ $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ 2.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิจนกระทั่งได้ 37 องศาเซลเซียส นำสารสกัดของตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร (µL) ทำปฏิกิริยากับสารละลาย FRAP ปริมาตร 2850 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ทำปฏิกิริยาในการเปลี่ยนเป็นสาร $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบคำนวณปริมาณ Relative antioxidant activity (Thaipong et al., 2006)

2.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี reducing power นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และผสมกับสารละลาย potassium ferricyanide ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสาร trichloroacetic acid ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 x g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใส ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย $FeCl_3$ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปประเมินค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (Li et al., 2012)

2.6.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี Fe^{2+} -chelating activity นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับเอทานอล 3.7 มิลลิลิตร และสารละลาย $FeCl_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ferrozine ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปประเมินค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร (Li et al., 2012)

2.6.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี hydroxyl scavenging activity ทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระชนิด hydroxyl โดยใช้ปฏิกิริยา Fenton ที่มีการเติมสาร $FeSO_4$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ใช้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสาร ethylene diamine tetra acetic acid ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และผสมสาร 2-deoxyribose ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยเติมในบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 หลังจากนั้นเติมสารอนุมูลอิสระ H_2O_2 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใช้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสาร 2.8% trichloroacetic acid และ 1% thiobarbituric acid อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที นำไปประเมินค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (Je et al., 2009)

2.7 การเลียนแบบกระบวนการย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก

นำตัวอย่างผงแห้ง 1 กรัม เติม Saline solution 1 มิลลิลิตร ปรับ pH 2.0 ด้วยกรด HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เติมเอนไซม์ pepsin 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 85 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการปรับ pH 6.0 ด้วย $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เติมกรดน้ำดี (bile acid) 3มิลลิลิตร เขย่ากลับไป-มา หลาย ๆ ครั้ง เติมเอนไซม์pancreatin และ lipase อย่างละ 2 มิลลิลิตร เขย่ากลับไป-มา หลาย ๆ ครั้ง ปรับ pH 6.8 วางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 85 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Serventi et al., 2013) หยุดปฏิกิริยาโดยวางบนน้ำแข็งทันที นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ความเร็วรอบ 30,000-45,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธีต่าง ๆ ดังข้อ 2.6

2.8 การวิเคราะห์สถิติ

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของทุกตัวอย่างแสดงด้วยค่าเฉลี่ย mean ± standard error of mean (SEM) และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมด (total phenolic compounds) โดยผลการวิเคราะห์เป็นการแสดงว่าสารตัวอย่างนั้นมีประสิทธิภาพในการให้อิเล็กตรอนต่อสารอนุมูลอิสระมากน้อยเพียงใด ทั้งนี้ ชนิดของสารละลายที่ใช้สกัดมีความสำคัญต่อผลลัพธ์ปริมาณของสารออกฤทธิ์ ผลการทดลองการสกัดวัตถุดิบด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด (ตารางที่ 1) พบว่า น้ำและเมทานอลสามารถสกัดสารฟีนอลิกจากดอกกระเจียวกาบรองดอกสีแดงใกล้เคียงกัน และมีปริมาณมากกว่า 2 เท่าของกาบรองดอกสีเขียว ทั้งนี้ การสกัดกาบรองดอกสีแดงด้วยเมทานอลทำให้มีสารฟีนอลิกปริมาณใกล้เคียงกับสารฟีนอลิกที่พบในขิงผง ในขณะที่เหง้าของดอกกระเจียวสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิดมีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด งานวิจัยของ Ismail และคณะ (2012) แสดงว่าการสกัดขิงด้วยสารละลายผสมของน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์อย่างละ 50% ทำให้มีสารฟีนอลิกรวมปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดอื่น เนื่องจากสารละลายน้ำผสมเอทานอลลมีค่าคงที่การเป็นขั้วของไดอิเล็กตริก (dielectric constant) สูง ทำให้สามารถสกัดสารฟีนอลิกจากเซลล์พืชได้ปริมาณมาก

ฟลาโวนอยด์เป็นสารรงควัตถุที่มีหลายสี เช่น สีแดง สีเหลือง สีม่วง ทำหน้าที่ดึงดูดแมลงให้ผสมเกสรของพืช ฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมอาหารเพื่อการบริโภคและมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หลายรูปแบบ (Tohma et al., 2016) ผลการทดลองในตารางที่ 1 แสดงว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีในการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดง กาบรองดอกสีเขียว และขิงผง ในขณะที่การใช้สารละลายอะซิโตนเป็นตัวทำละลายจะได้ปริมาณสารกลุ่มฟลาโว-นอยด์จากเหง้าของดอกกระเจียวมากที่สุด ($p < 0.05$)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัด

ตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิก (GAE) ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม)			ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัม Catechin ต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม)		
	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล
กาบสีแดง	130.5± 26.1^{a}	41.8± 0.4^{b}	115.3± 16.0^{a}	603.3± 47.1^{a}	593.3± 61.3^{a}	386.6± 23.6^{c}
กาบสีเขียว	61.1± 10.0^{bc}	40.4± 1.3^{b}	65.4± 13.6 ^{b}	591.7± 16.5^{a}	436.7± 0.0^{b}	435.0± 49.5^{b}
เหง้า	46.7± 6.9 ^{c}	46.4± 6.8^{b}	46.2± 7.6^{c}	493.3± 61.2^{b}	613.3± 32.9^{a}	436.6± 0.0^{b}
ขิง	83.8± 10.6^{b}	71.4± 9.1^{a}	115.5± 6.7^{a}	586.7± 23.6^{a}	535.0 ±49.5^{ab}	520.0± 23.6^{a}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย±SEM ตัวอักษร^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวของสารฟีนอกลิก หรือ ฟลาโวนอยด์ แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

3.2 ABTS

วิธีประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 2 ลักษณะใหญ่ คือ การให้ไฮโดรเจนอะตอมและ การให้อิเล็กตรอน วิธีวิเคราะห์ ABTS และ DPPH เป็นหลักการให้ไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอน ซึ่งมีงานวิจัยอื่นที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากหน่อไม้ชนิด Asparagus พบว่าวิธีวิเคราะห์ ABTS และ DPPH ให้ผลการทดลองเป็นไปทิศทางเดียวกัน (Sun et al., 2005) งานวิจัยครั้งนี้ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดทั้งที่เป็นวัตถุดิบก่อนและหลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหาร เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS ให้ผลการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิธีวิเคราะห์ DPPH (ตารางที่ 2 และ 3) แสดงว่าสารออกฤทธิ์ในตัวอย่างทั้งหมดมีการออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อสาร ABTS ได้ดี ทั้งที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นกรด pH 1.5 เลียนแบบกระเพาะอาหาร และ pH 6.5 เลียนแบบลำไส้เล็ก จึงมีความน่าเชื่อถือว่าสารสกัดจากดอกกระเจียวสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การสกัดดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงและสีเขียว รวมถึงขิงผงด้วยสารละลายเมทานอล หรือน้ำ (ตารางที่ 2) ทำให้มีสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เกิดจากปฏิกิริยาของสาร ABTS ได้ใกล้เคียงกัน สำหรับเหง้าของดอกกระเจียว และวิตามินอี ควรใช้สารอะซิโตนเป็นตัวทำละลายเพื่อได้สารออกฤทธิ์ที่ต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา ABTS ได้ดีที่สุด แนวโน้มดังกล่าวยังคงเดิมเมื่อผ่านกระบวนการเลียนแบบการย่อยอาหาร ถึงแม้ว่าปริมาณการออกฤทธิ์จะลดลงอย่างมากโดยพบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีฤทธิ์ต้าน ABTS ลดลง 85-95 % เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างสด ที่ผ่านการอบแห้งแสดงว่าสารสำคัญจากตัวอย่างอาหารที่ยังเหลืออยู่ในสภาวะเลียนแบบลำไส้เล็กมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่จำเพาะกับปฏิกิริยาของสาร ABTS

3.3 DPPH

วิธี DPPH เป็นการประเมินความสามารถของสารออกฤทธิ์ในอาหารต่อการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระของ DPPH ทำให้เปลี่ยนเป็นรูปแบบของ DPPH-H ซึ่งอยู่ในรูปแบบที่ไม่เป็นสารอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระ DPPH เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีความคงตัว (stable organic free radical) ในขณะที่เมทานอลสามารถละลายสารอินทรีย์ได้ดี ดังนั้น การใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสกัดดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงทำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่มีความสามารถต้านสารอนุมูลอิสระกลุ่ม DPPH ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Do et al. (2014) ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัดสารจากพืชชนิด *Limnophila aromatic* (Lamk.) Merr. ได้ผลฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย หลังจากผ่านกระบวนการเลียนแบบการย่อยอาหาร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ยังคงมีระดับสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับขิงผงและวิตามินอี ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมในงานวิจัยนี้ โดยหลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหาร ดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงสกัดด้วยสารเมทานอลมีฤทธิ์ต้าน DPPH ลดลง 82 % น้อยกว่าขิงผงซึ่งมีฤทธิ์ลดลง 96-98 % ในทุกตัวทำละลาย สำหรับกาบรองดอกสีเขียวควรใช้สารละลายอะซิโตนหรือน้ำเพื่อได้สารออกฤทธิ์ที่เหมาะสมต่อการต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม DPPH

ตารางที่ 2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดประเมินด้วยวิธี ABTS

ตัวอย่าง	สารสกัดสด			เลียนแบบการย่อยอาหาร		
	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล
กาบสีแดง	87.7± 0.3^{b}	24.8± 0.3^{c}	91.3 ±0.0^{a}	5.5± 0.0^{b}	0.7± 0.2^{c}	7.3± 0.9^{a}
กาบสีเขียว	89.5± 0.7^{a}	21.3± 0.1^{b}	88.1± 1.5^{a}	7.8 ±0.1^{a}	4.1± 0.6^{b}	5.5 ±0.5^{b}
เหง้า	40.7± 1.6^{b}	18.7±0.1^{c}	64.9±1.6^{a}	3.9 ±0.3^{b}	1.6± 0.1^{c}	6.3± 0.1^{a}
ขิง	84.4 ±3.9^{a}	73.7± 3.4^{b}	90.6± 0.2^{a}	3.1± 0.2^{a}	1.3± 0.3^{b}	3.7± 0.2^{a}
วิตามินอี	10.2± 0.2^{c}	62.8± 0.8^{a}	56.8± 0.0^{b}	0.8 ±0.1^{b}	6.8± 1.0^{a}	1.6 ±0.2^{b}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย±SEM มีหน่วยเป็น % inhibition

ตัวอักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวของสารสกัดสด หรือ แต่ละแถวของการเลียนแบบการย่อยอาหาร แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดประเมินด้วยวิธี DPPH

ตัวอย่าง	สารสกัดสด			เลียนแบบการย่อยอาหาร		
	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล
กาบสีแดง	42.2 ±0.2^{b}	32.7 ±0.8^{c}	67.2 ±0.8^{a}	3.7 ±0.1^{b}	0.8± 0.3^{c}	11.8± 0.4^{a}
กาบสีเขียว	10.6 ±0.9^{b}	60.9 ±0.5^{a}	1.4 ±0.6^{c}	7.6 ±0.2^{b}	9.0 ±0.0^{a}	3.8 ±0.3^{c}
เหง้า	17.4 ±2.0^{a}	12.9± 0.3^{b}	5.2± 0.4^{c}	7.9± 0.3^{b}	8.7± 0.1^{a}	0.5± 0.0^{c}
ขิง	18.3± 1.3^{c}	53.1± 0.2^{b}	62.5± 0.2^{a}	0.3± 0.0^{c}	1.2 ±0.1^{b}	2.1± 0.1^{a}
วิตามินอี	2.7 ±0.2^{c}	65.2 ±0.5^{a}	59.1± 0.0^{b}	1.1± 0.2^{c}	8.4± 0.2^{a}	1.9 ±0.2^{b}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย ±SEM มีหน่วยเป็น % inhibition

ตัวอักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวของสารสกัดสด หรือ แต่ละแถวของการเลียนแบบการย่อยอาหาร แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด FRAP ของสารสกัด

การบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารโลหะหนักชนิดเหล็กหรือทองแดงมากผิดปกติ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายตามกลไกของปฏิกิริยา Fenton โดยที่เหล็ก (Fe^{2+}) หรือ ทองแดง (Cu^{+}) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กระตุ้นให้ H_2O_2 เปลี่ยนเป็น hydroxyl radical ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์รุนแรงกว่า H_2O_2 มีการกระตุ้นโมเลกุลอื่นในร่างกาย เช่น คาร์โบไฮเดรต หรือ ดีเอ็นเอ (DNA) เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน วิธีประเมินความสามารถของสารพฤกษ-เคมีในพืชต่อการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดังกล่าว นิยมใช้วิธี FRAP เนื่องจากวิธีนี้มีจุดเด่นคือ เป็นการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยตรงที่แสดงการเป็นสารให้อิเล็กตรอนต่อ Fe^{3+} ทำให้ลดการเปลี่ยนรูปแบบ

อิออนของเหล็ก Fe^{3+} ไปเป็นอิออน Fe^{2+} (Tohma et al., 2016)

อะซิโตนสามารถละลายสารออกฤทธิ์ของดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีเขียวและเหง้าทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากาบรองดอกสีแดงและขิงผง (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตาม หลังจากผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารพบว่า สารสกัดจากกาบรองดอกสีแดงที่ละลายในเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด FRAP สูงใกล้เคียงกับสารสกัดจากกาบรองดอกสีเขียวและเหง้า ซึ่งสะท้อนว่าชนิดของสารออกฤทธิ์ในดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงแตกต่างจากสารออกฤทธิ์ในส่วนกาบรองดอกสีเขียว เหง้า ขิง และวิตามินอี ทำให้ทนต่อสภาวะการเลียนแบบการย่อยอาหารได้ดี

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดประเมินด้วยวิธี FRAP

ตัวอย่าง	สารสกัดสด			เลียนแบบการย่อยอาหาร		
	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล
กาบสีแดง	13.6 ±0.8^{c}	35.1 ±0.6^{b}	39.2 ±0.2^{a}	3.1 ±0.2^{c}	5.1± 0.4^{b}	18.2± 0.2^{a}
กาบสีเขียว	59.1 ±2.3^{b}	89.6 ±0.4^{a}	65.9± 3.1^{b}	4.6± 0.4^{c}	17.7± 1.3^{a}	12.2± 1.5^{b}
เหง้า	61.1 ±0.4^{b}	86.2± 1.1^{a}	48.0± 0.6^{c}	6.2± 0.4^{b}	18.7± 0.4^{a}	4.0 ±0.0^{c}
ขิง	52.0± 1.2^{a}	54.2± 0.2^{a}	45.4± 2.7^{b}	6.3± 0.6^{b}	14.5± 0.9^{a}	4.4 ±0.6^{b}
วิตามินอี	88.7± 0.0^{a}	42.7± 1.5^{b}	10.6± 0.8^{c}	15.8 ±0.2^{a}	15.1 ±0.4^{a}	0.6 ±0.0^{b}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย ± SEM มีหน่วยเป็น % inhibition

ตัวอักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวของสารสกัดสด หรือ แต่ละแถวของการเลียนแบบการย่อยอาหาร แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

3.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด Reducing power ของสารสกัด

Reducing power เป็นการประเมินความสามารถของสารสกัดในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมต่อสารอนุมูลอิสระ ทำให้โมเลกุลเชิงซ้อนของ Fe^{3+}/FeSCN เปลี่ยนเป็นรูปแบบของ Fe^{2+} ลดลง วิธีการวิเคราะห์นี้เป็นการประเมินผลปฏิกิริยาทางอ้อมแต่มีเป้าหมายเดียวกับวิธี FRAP เพื่อประเมินการลดลงของเหล็กรูปแบบ Fe^{2+} (You et al., 2010) การสกัดดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวด้วยน้ำหรือสารละลายอะซิโตนทำให้ได้สารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 5) หลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารพบว่าสารสกัดจากกาบรองดอกสีเขียวที่ละลายน้ำมีฤทธิ์ reducing power มากกว่าสารสกัดจากกาบรองดอกสีแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ขิงผงละลายน้ำมีฤทธิ์ของ reducing power สูงที่สุด อาจเนื่องมาจากขิงมีสารออกฤทธิ์หลายชนิด เช่น gingerol, hexahydrocurcumin, quercetin ซึ่งมีรายงานวิจัยของ Kishk และ Sheshetawy (2010) แสดงว่าการสกัดขิงความเข้มข้น 0.75% ด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำให้มีสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีประสิทธิภาพสูงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ใช้สารต้านอนุมูลอิสระชนิด butylated hydroxytoluene

3.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด Fe^{2+} -chelating activity ของสารสกัด

การที่โมเลกุลชนิดใด ๆ ในอาหารเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเนื่องจากธาตุเหล็กเป็นตัวกระตุ้น ส่งผลให้เกิดสารอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งการวิเคราะห์ทำให้พบสารเหล็กในรูปแบบ Fe^{2+} อย่างไรก็ตาม

ถ้าผลิตภัณฑ์อาหารนั้นมีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ด้วยการทำหน้าที่ chelating ธาตุเหล็ก ทำให้มีปฏิกิริยาป้องกันการก่อตัวอิออนของธาตุเหล็กรูปแบบ Fe^{2+} ส่งผลให้ปริมาณสารอนุมูลอิสระลดลงในผลิตภัณฑ์อาหาร (Min et al., 2014) งานวิจัยครั้งนี้พบว่า ตัวอย่างอาหารทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำ ทำให้มีสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Fe^{2+} สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายอะซีโตนหรือเมทานอล (ตารางที่ 6) โดยพบว่าดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวมีฤทธิ์เป็นสาร chelating Fe^{2+}ใกล้เคียงกับขิงผง ในขณะที่วิตามินอีมีฤทธิ์เป็นสาร chelating Fe^{2+} น้อยที่สุด

เมื่อนำสารสกัดทำปฏิกิริยาเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารพบว่า การใช้น้ำเป็นตัวทำละลายวัตถุดิบทุกชนิดทำให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Fe^{2+} -chelating activity ทั้งนี้ ฤทธิ์ต้าน Fe^{2+} ของกาบรองดอกสีเขียวลดลง 59 % ในขณะที่กาบรองดอกสีแดงมีฤทธิ์ลดลง 38 % ซึ่งมีรูปแบบคล้ายกับขิงผงที่มีฤทธิ์ลดลง 44 % เมื่อนำค่าที่มากที่สุดของแต่ละตัวอย่างวัตถุดิบไปวิเคราะห์สถิติพร้อมกัน (ไม่แสดงผลในตารางที่ 6) ดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์เป็นสาร chelating Fe^{2+} สูงที่สุด

ตารางที่ 5 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดประเมินด้วยวิธี Reducing power

ตัวอย่าง	สารสกัดสด			เลียนแบบการย่อยอาหาร		
	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล
กาบสีแดง	67.7 ±0.8^{a}	69.7 ±0.1^{a}	5.6 ±0.8^{b}	11.7± 0.0^{b}	15.3 ±1.6^{a}	10.8± 0.3^{b}
กาบสีเขียว	60.9± 0.1^{a}	66.9 ±2.3^{a}	20.9 ±0.8^{b}	26.0 ±0.9^{a}	20.6 ±0.8^{b}	8.1 ±0.1^{c}
เหง้า	32.1 ±0.8^{a}	31.0 ±0.5^{a}	13.0± 2.0^{b}	10.0± 0.8^{b}	25.1± 4.4^{a}	22.3± 3.3^{a}
ขิง	62.1 ±0.9^{c}	97.3 ±0.1^{a}	80.5 ±1.6^{b}	60.0 ±3.3^{a}	41.8 ±2.5^{b}	32.3 ±0.8^{c}
วิตามินอี	85.2 ±0.6^{a}	3.4 ±0.8^{c}	71.8± 0.7^{b}	16.2 ±0.3	22.3± 3.3	23.0± 2.5

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย±SEM มีหน่วยเป็น % inhibition

ตัวอักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวของสารสกัดสด หรือ แต่ละแถวของการเลียนแบบการย่อยอาหาร แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดประเมินด้วยวิธี Fe^{2+} -chelating activity

ตัวอย่าง	สารสกัดสด			เลียนแบบการย่อยอาหาร		
	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล
กาบสีแดง	45.2 ±0.5^{a}	9.3 ±0.2^{b}	9.6 ±0.1^{b}	27.9 ±0.2^{a}	0.8± 0.2^{c}	3.1± 0.5^{b}
กาบสีเขียว	51.6 ±0.3^{a}	11.1± 0.2^{b}	14.7 ±0.5^{b}	21.2 ±0.6^{a}	4.6 ±0.1^{c}	7.9 ±0.1^{b}
เหง้า	22.4 ±0.5^{a}	4.2 ±0.2^{c}	8.2 ±0.1^{b}	7.4 ±0.4^{a}	1.2± 0.2^{c}	2.6± 0.2^{b}
ขิง	44.2± 1.2^{a}	7.8± 0.4^{c}	16.1± 2.8^{b}	24.6± 0.9^{a}	1.4 ±0.3^{c}	6.5 ±0.2^{b}
วิตามินอี	11.6± 0.8^{a}	1.8 ±0.5^{b}	2.4 ±0.0^{b}	4.7± 0.1^{a}	0.5 ±0.1^{b}	0.7 ±0.1^{b}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย ±SEM มีหน่วยเป็น %radical scavenging activity

ตัวอักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวของสารสกัดสด หรือ แต่ละแถวของการเลียนแบบการย่อยอาหาร แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

3.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด hydroxyl radical ของสารสกัด

สารอนุมูลอิสระชนิด hydroxyl radical จัดว่ามีความรุนแรงสูงสุดในสารอนุมูลอิสระกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) ซึ่ง hydroxyl radical สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลในร่างกาย เช่น กรดอะมิโน โปรตีน ดีเอ็นเอ ดังนั้น การลดปริมาณสาร hydroxyl radical จึงเป็นการป้องกันเซลล์ในร่างกายไม่ทำงานผิดปกติ การสกัดดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงด้วยเมทานอลและอะซิโตนทำให้ได้สารที่สามารถออกฤทธิ์ต้าน hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) ดีที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับกาบรองดอกสีเขียวที่ถูกสกัดด้วยเมทานอล (ตารางที่ 7) ในขณะที่การสกัดเหง้าด้วยอะซิโตนจะมีสารออกฤทธิ์ $OH^{\cdot}$ สูง สิ่งที่น่าสนใจคือหลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารพบว่าดอกกระเจียวมีการออกฤทธิ์ต้าน $OH^{\cdot}$ ดีกว่าขิงผงซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน ทั้งนี้ การสกัดด้วยเมทานอลทำให้ฤทธิ์ต้าน $OH^{\cdot}$ ของดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวลดลง 68 % และ 79 % ตามลำดับ ในขณะที่ขิงผงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\cdot}$ ลดลง 72%

ตารางที่ 7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดประเมินด้วยวิธี hydroxyl scavenging activity

ตัวอย่าง	สารสกัดสด			เลียนแบบการย่อยอาหาร		
	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล	น้ำ	อะซิโตน	เมทานอล
กาบสีแดง	15.4 ±0.2^{b}	56.3 ±0.2^{a}	57.3 ±0.2^{a}	6.4 ±0.7^{b}	16.6 ±0.3^{a}	18.3 ±0.7^{a}
กาบสีเขียว	18.3 ±1.1^{b}	12.0 ±0.3^{b}	60.5 ±6.3^{a}	8.6 ±0.1^{b}	3.2 ±0.0^{c}	12.5 ±0.4^{a}
เหง้า	11.0± 1.1^{b}	52.8± 3.7^{a}	8.1 ±0.5^{b}	6.5 ±0.6^{b}	8.1 ±0.3^{a}	1.6 ±0.5^{c}
ขิง	17.9± 0.2^{c}	21.7± 0.2^{b}	43.7± 5.2^{a}	2.5± 0.7^{c}	6.5± 0.3^{b}	12.0 ±0.1^{a}
วิตามินอี	23.3 ±1.1^{a}	15.9± 0.2^{c}	20.8± 0.3^{b}	12.2± 0.1^{b}	6.8 ±0.1^{c}	17.2± 2.0^{a}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย±SEM มีหน่วยเป็น% inhibition

ตัวอักษร ^{a,b,c} ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวของสารสกัดสด หรือ แต่ละแถวของการเลียนแบบการย่อยอาหาร แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

3.8 ความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหาร

รายงานวิจัยแสดงว่าสารกลุ่มโพลีฟีนอลในอาหารถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กประมาณ 48% และออกฤทธิ์ที่ลำไส้ใหญ่ประมาณ 42% สำหรับปริมาณ 10% ที่เหลือมีการจับพันธะติดกับโมเลกุลชนิดอื่นในอาหารทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกาย (Saura-Calixto et al., 2007) การที่สารประกอบโพลีฟีนอลสร้างพันธะกับองค์ประกอบโมเลกุลอื่น ๆ ของอาหาร อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ในลำไส้เล็กเข้าทำการสลายพันธะสารโพลีฟีนอล จึงมีสารโพลีฟีนอลแยกเป็นอิสระในปริมาณแตกต่างกัน นักวิจัยบางกลุ่มรายงานผลการทดลองว่าสภาวะกรดและเอนไซม์ pepsin ในกระเพาะอาหารทำให้โมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระแยกพันธะออกจากโมเลกุลอื่นในอาหารชนิดนั้นๆ และเมื่อผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กทำให้ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น นอกจากนี้ เอนไซม์ pancreatin ในลำไส้เล็กสามารถย่อยสลายโมเลกุลเชิงซ้อนและมีการปลดปล่อยโมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้น ทำให้โมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระจับพันธะกับสารอนุมูลอิสระมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่แสดงว่าเมื่อสิ่งแวดล้อมในปฏิกิริยามีระดับ pH เพิ่มขึ้น ทำให้การแตกตัวเป็นประจุของโมเลกุลสารต้านอนุมูลอิสระ

ลดลง สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น (Prior et al., 2005)

ผลการทดลองของงานวิจัยหลายชิ้นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารพฤกษเคมีในพืชชนิดต่างๆ ภายหลังผ่านกระบวนการเลียนแบบการย่อยอาหารมีความขัดแย้งกันหลายประการ นักวิจัยอีกหลายท่านรายงานผลการทดลองการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารทำให้สารสกัดมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง โดยมีข้อสันนิษฐานว่าสารประกอบฟีนอลิกอาจจะมีการเปลี่ยนรูปแบบโครงสร้างในสภาวะด่างของลำไส้เล็ก หรือสารประกอบฟีนอลิกอาจจะจับพันธะกับโมเลกุลอื่นทำให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ใหญ่ขึ้นจึงไม่สามารถผ่านผนังเมมเบรนที่ใช้เลียนแบบลำไส้เล็ก (Bermudez-Soto et al., 2007) งานวิจัยหลายชิ้นแสดงผลการทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหาร เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าลดลง 57% วิธี ABTS ลดลง 46% วิธี DPPH ลดลง 1.5-2.1 เท่า (Akillioglu and Karakaya, 2010; Bouayed et al., 2011) งานวิจัยที่มีการแบ่งส่วนสารสกัดออกเป็นสารประกอบกลุ่มละลายน้ำและละลายไขมัน พบว่า สารสกัดกลุ่มละลายน้ำออกฤทธิ์ต้านสาร DPPH ลดลงเหลือ 4% และกลุ่มละลายไขมันออกฤทธิ์ต้านสาร DPPH ลดลงเหลือ 1% เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดตั้งต้นที่ไม่ผ่านกระบวนการเลียนแบบการย่อยอาหาร (Rodriguez-Roque et al., 2013)

ผลงานวิจัยครั้งนี้แสดงว่าภายหลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารทำให้สารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาจเนื่องมาจากการทดสอบสารสกัดในสภาวะการเลียนแบบการย่อยอาหารซึ่งมีความเป็นกรด-ด่างรุนแรงทำให้โครงสร้างโมเลกุลของสารสกัดเปลี่ยนรูปแบบจึงไม่สามารถทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม คนไทยบริโภคอาหารหลายชนิดพร้อมกัน มีความเป็นไปได้ว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ของอาหารที่รับประทานพร้อมกับดอกกระเจียวอาจช่วยป้องกันการสัมผัสโดยตรงระหว่างดอกกระเจียวและสภาวะความเป็นกรด-ด่างของระบบทางเดินอาหารดังนั้น งานวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกกระเจียวในสถานการณ์ที่มีองค์ประกอบของอาหารชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน

สรุปผลการวิจัย

การสกัดดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงด้วยน้ำและเมทานอลทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกปริมาณมากที่สุด และมีปริมาณมากกว่า 2 เท่าของกาบรองดอกสีเขียว ในขณะที่เหง้าของดอกกระเจียวสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิดมีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด ดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวอบแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS ดีที่สุด หลังผ่านการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารพบว่า สารสกัดจากดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวออกฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระชนิด hydroxyl radical และทำหน้าที่เป็น Fe^{2+}–chelating agent ได้ดีที่สุด ถึงแม้ว่าสภาวะการเลียนแบบกระบวนการย่อยอาหารทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของทุกตัวอย่างลดลง 40-90% ซึ่งแตกต่างกันตามวิธีวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม ดอกกระเจียวส่วนกาบรองดอกสีแดงและสีเขียวยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดและใกล้เคียงกับขิงผง ดังนั้น ดอกกระเจียวแดงจึงเป็นพืชที่สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้มีการบริโภคเป็นอาหาร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณรายได้ประจำปี 2558

เอกสารอ้างอิง

รัฐศักดิ์ พลสิงห์. (2553). ปทุมมา จากป่าสู่เมืองสร้างรายได้สู่ชุมชน. น.ส.พ.กสิกร 83(5): 25-36.

Akillioglu, H.G., and Karakaya, S. (2010). Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and *in vitro* digestion process. Food Science and Biotechnology 19(3): 633-639.

Bermudez-Soto, M.A., Tomas-Barberan, F.A., and Garcia-Conesa, M.T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. Food Chemistry 102(3): 865-874.

Bouayed, J., Hoffmann, L., and Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake. Food Chemistry 128(1): 14-21.

Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredko, F.E., Ismadji, S., and Ju, Y.H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophilaromatica*. Journal of Food and Drug Analysis 22: 296-302.

Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 1841-1856.

Ismail, R.K., and Jagan Mohan Rao, L. (2012). Separation of polyphenol rich fraction from dried ginger rhizomes. Journal of Applicable Chemistry 1(3): 368-375.

Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., and Ahn, C.B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International 42: 1266-1272.

Kishk, Y.F.M., and Sheshetawy, H.E.EL. (2010). Optimization of ginger (Zingiber officinale) phenolics extraction conditions and its antioxidants and radical scavenging activities using response surface methodology. World Journal of Dairy & Food Sciences 5(2): 188-196.

Krup, V., Prakash, L.H., and Harini, A. (2013). Pharmacological activities of Turmeric (*Curcuma longa,* Linn): a review. Journal of Homeopathy & Ayurvedic Medicine 2(2): 2-4.

Li, X., Luo, Y., Shen, H., and You, J. (2012). Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates. Journal of the Science of Food and Agriculture 92: 292-298.

Min, B., McClung, A., and Chen, M.H. (2014). Effect of hydrothermal processes on antioxidants in brown, purple and red bran whole grain rice (*Oryza sativa* L.). Food Chemistry 159: 106-115.

Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity andphenolics in food and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4290-4302.

Pukalskiene, M., Venskutonis, P.R., and Pukalskas, A. (2015). Phytochemical composition and

antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients. Journal of Functional Foods 15: 233-242.

Rodriguez-Roque, M.J., Rojas-Grau, M.A., Elez-Martinez, P., and Martin-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. Food Chemistry 136: 206-212.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., and Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. Food Chemistry 201: 492-501.

Serventi, L., Chitchumroonchokchai, C., Riedl, K.M, Kerem, Z., Berhow, M.A., Vodovotz, Y., Schwartz, S.J., and Failla, M.L. (2013). Saponins from soy and chickpea: stability during breadmaking and *in vitro* bioaccessibility. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 6703-6710.

Sun, T., Tang, J., and Powers, J.R. (2005). Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(1): 42-48.

Thaipong, K., Boonprakorb, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., and Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis 19: 669-675.

Tohma, H., Gulcin, I., Bursal, E., Goren, A.C., Alwasel, S.H., and Koksal, E. (2016). Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. Food Measure DOI 10.1007/s11694-016-9423-z.

Wongwattanasathien, O., Kangsadahlampai, K., and Tongyonk, L. (2010). Antimutagenicity of some flowers grown in Thailand. Food and Chemical Toxicology 48: 1045-1051.

You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M., and Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry 120: 810-816.

Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64: 555-559.

❑❑❑❑❑