การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชานอ้อย

วิทยานิพนธ์

ของ

ปนัดดา เสนารัตน์

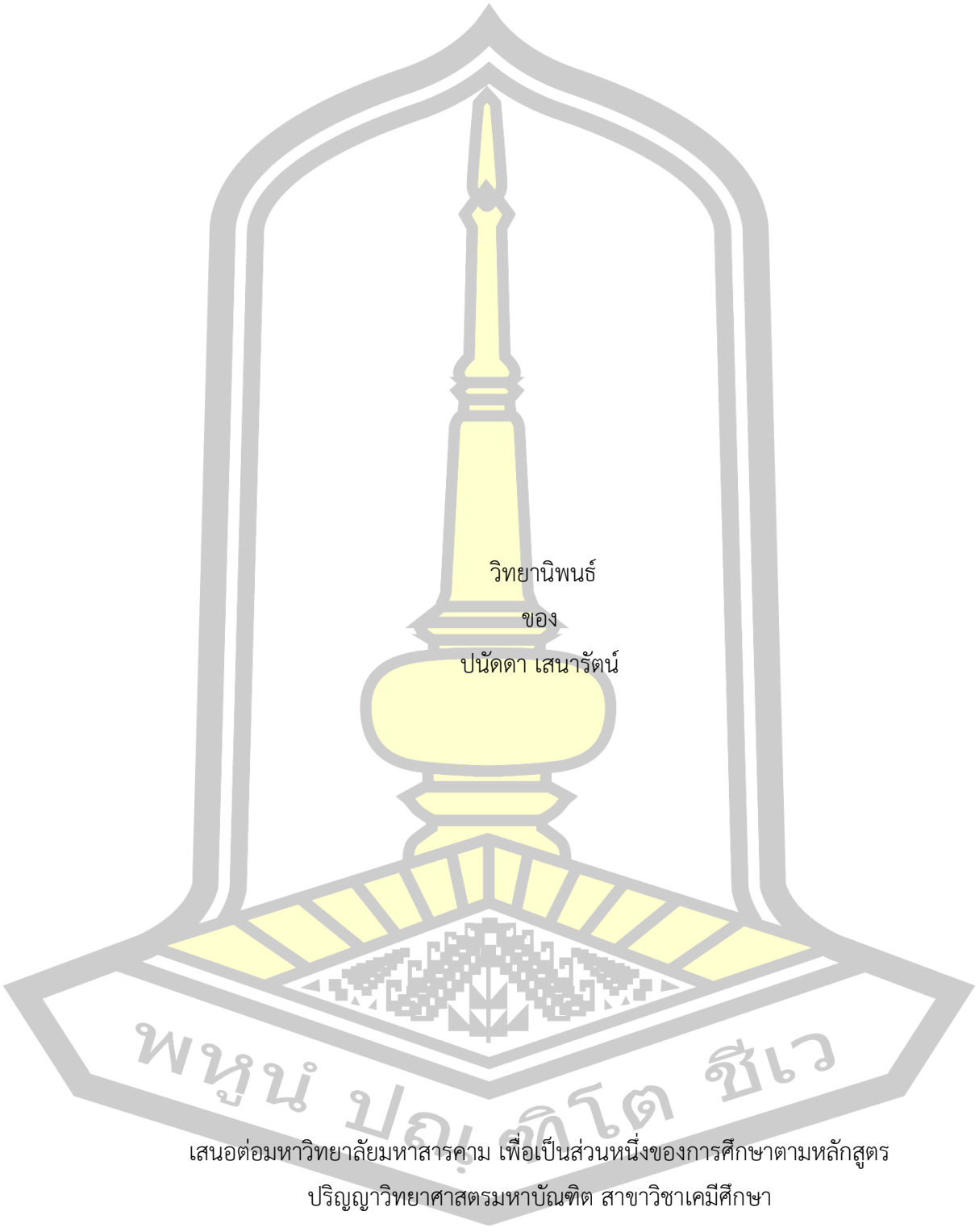
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชานอ้อย



วิทยานิพนธ์

ของ

ปนัดดา เสนารัตน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Determination of phytochemical contents and antioxidant activity of sugarcane bagasse extracts

Panadda Sanarat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Chemistry Education)

May 2020

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวปนัดดา เสนารัตน์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. ฌาณุกรณ์ ทับทิมใส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รศ. ดร. ประสงค์ สีหานาม)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. เสนีย์ เครือเนตร)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. สิริพิศ พิศชวนชม)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผศ. ดร. ฌาณุกรณ์ ทับทิมใส)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ชื่อเรื่อง การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชานอ้อย

ผู้วิจัย ปนัดดา เสนารัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประสงค์ สีหานาม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เคมีศึกษา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารพฤกษเคมีจากชานอ้อย 2 สายพันธุ์ คือ ขอนแก่น 1 และ ขอนแก่น 2 โดยการหมักด้วยเอทานอล แล้วนำไปตรวจสอบสารพฤกษเคมี ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ฟลาโวนอยด์รวม (TFC) ไตรเทอร์พีนอยด์รวม (TTC) และสเตอรอลรวม (TSC) มีปริมาณแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของอ้อย โดยปริมาณ TPC, TFC และ TTC พบมากในสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 ในขณะที่ปริมาณ TSC พบมากในสายพันธุ์ขอนแก่น 1 สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระสูงกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 1 ในทุกวิธีที่ตรวจวัด สารพฤกษเคมีทุกชนิดมีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อกันโดยเฉพาะ TPC, TFC และTTC และมีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS ส่วน TSC มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี FRAP สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase และ tyrosinase สูงกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 1 แต่ฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีปริมาณสารพฤกษเคมีสูงกว่าสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 1 ยกเว้น epicatechin ในขณะที่ quercetin, *p*-coumaric acid และ catechin คือ สารหลักที่พบมากที่สุดตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชานอ้อยเป็นแหล่งสำคัญของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซึ่งอาจนำสารพฤกษเคมีจากชานอ้อยนี้ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์เพื่อส่งเสริมสุขภาพและความงามได้

คำสำคัญ : สารพฤกษเคมี, ชานอ้อย, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

TITLE Determination of phytochemical contents and antioxidant activity of sugarcane bagasse extracts

AUTHOR Panadda Sanarat

ADVISORS Associate Professor Prasong Srihanam , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Chemistry Education

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2020

ABSTRACT

The objective of this research was to extract the phytochemicals from 2 varieties of bagasse sugarcane; Khon Kaen 1 and Khon Kaen 2 by maceration with ethanol. The extracts were then investigated for phytochemicals contents. The results showed that total phenolic content (TPC), total flavonoids content (TFC), total triterpenoid content (TTC) and total sterol content (TSC) were significantly different by the variety of sugarcane. The TPC, TFC and TTP had the highest in Khon Kaen 2 while TSC had the highest in Khon Kaen 1. The extract obtained from Khon Kaen 2 have free radical scavenging activity in higher potent than Khon Kaen 1 in every method used. All tested phytochemicals have positively correlated, especially for TPC, TFC and TTC. The TSC had high positively correlated to FRAP assay. The extract obtained from Khon Kaen 2 showed higher **α**-glucosidase and tyrosinase inhibition activity than Khon Kaen 1, but in lower activity than standard. The extract obtained from Khon Kaen 2 found higher tested phytochemicals than Khon Kaen 1, except epicatechin. The quercetin, *p*-coumaric acid and catechin were the main phenolic found the highest content in the Khon Kaen 2 bagasse extract, respectively. This obtained results indicated that the bagasse sugarcane is an important source of phytochemicals which expressed antioxidant and enzymatic inhibition activities. It might be used the phytochemicals from the bagasse sugarcane for health supplement and beauty applications.

Keyword : phytochemicals, bagasse, antioxidant activity, enzyme inhibition activity

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาชี้แนะและช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ประสงค์ สีหานาม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฌาณุกรณ์ ทับทิมใส ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสนีย์ เครือเนตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพิศ พิศชวนชม ผู้ทรงคุณวุฒิสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำวิธีการทำวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร. ชุลีรัตน์ วงศ์ณรัตน์ ที่ช่วยแนะนำวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่อำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดลอง

ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่อบรมเลี้ยงดูจนเติบใหญ่และสนับสนุนการศึกษา ตลอดจนให้ความอบอุ่น กำลังใจ และคอยเคียงข้างตลอดมา คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบิดามารดาและบูรพาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด คุณความดีของทุกท่านจะยังคงอยู่ในใจด้วยความรัก และเคารพตลอดไป

ปนัดดา เสนารัตน์

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 หลักการและเหตุผล 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ 3

บทที่ 2 4

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 4

2.1 อนุมูลอิสระ 4

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ 6

2.3 สารพฤกษเคมี 9

2.3.1 นิยามสารพฤกษเคมี 9

2.3.2 ประเภทของสารพฤกษเคมี 10

2.3.2.1 แคโรทีนอยด์ 10

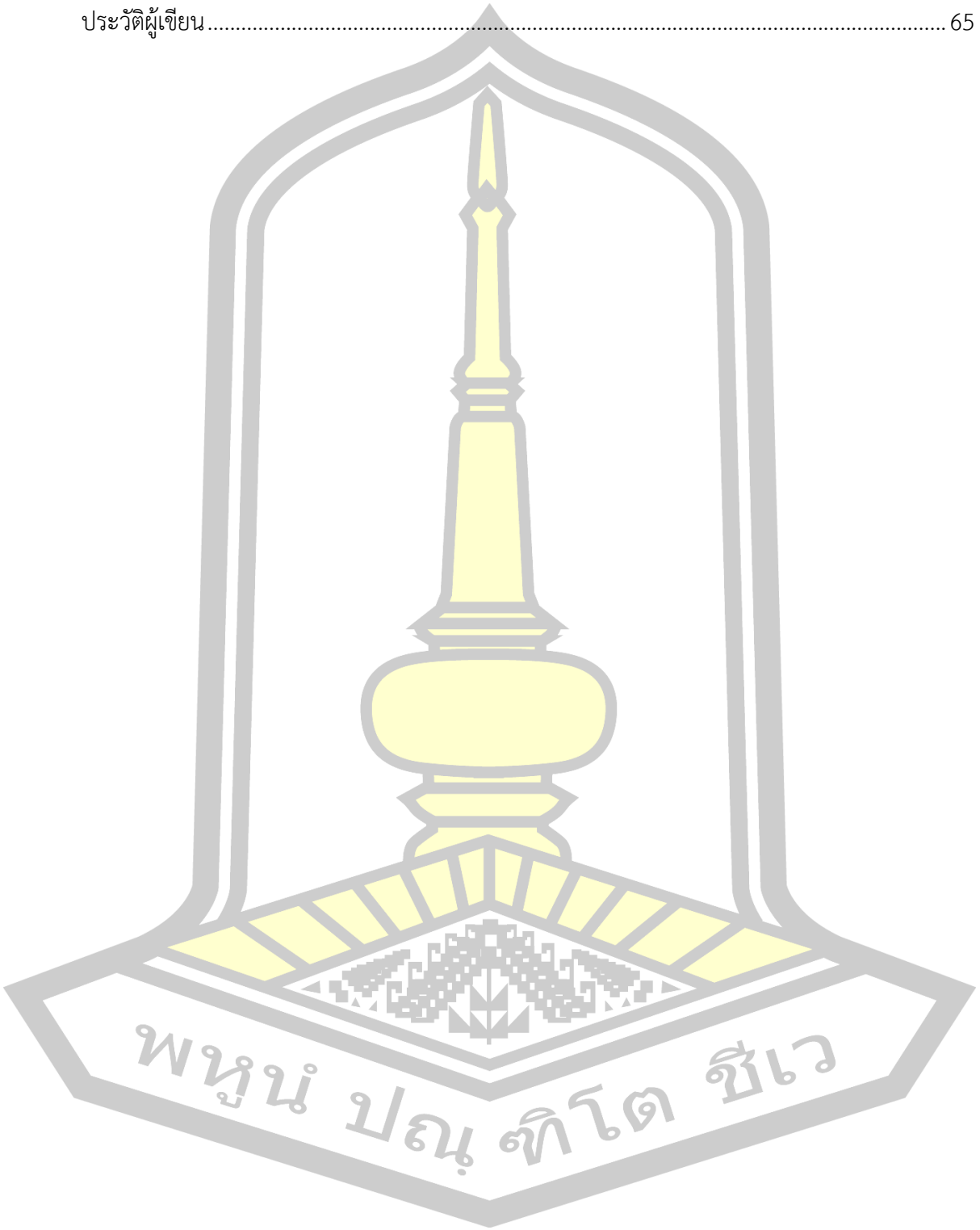
2.3.2.2 สารประกอบฟีนอลิก 11

2.3.2.2.1 กลุ่มกรดฟีนอลิก 12
2.3.2.2.2 กลุ่มฟลาโวนอยด์ 13
2.3.2.2.3 กลุ่มสติลบีนส์ (stilbenes) 15
2.3.2.2.4 กลุ่มแทนนินส์ 15
2.3.2.3 ไฟโตสเตอรอล 16
2.3.2.4 ซาโปนินส์ 16
2.3.2.5 ไตรเทอร์พีนอยด์ 17
2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมี 18
2.4.1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ 18
2.4.2 ฤทธิ์ต้านไวรัส 19
2.4.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง 19
2.4.4 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 19
2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 21
2.5.1 วิธีดักจับอนุมูลอิสระ ABTS 21
2.5.2 วิธีดักจับอนุมูลอิสระ DPPH 22
2.5.3 วิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน 22
2.6 อ้อย 23
2.7 การศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในอ้อย 25
บทที่ 3 27
วิธีดำเนินการวิจัย 27
3.1 ชานอ้อยตัวอย่าง 27
3.2 สารเคมี 27
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 28
3.4 วิธีการทดลอง 29

3.4.1 การเตรียมสารสกัด 29
3.4.2 การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี 29
3.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม 29
3.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 29
3.4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์รวม 30
3.4.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสเตอรอลรวม 30
3.4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชานอ้อย 31
3.4.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH 31
3.4.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ดักจับอนุมูล ABTS 31
3.4.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์การรีดิวซ์เหล็กไอออน 32
3.4.4 การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 32
3.4.4.1 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส 32
3.4.4.2 การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 32
3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีแต่ละชนิด 33
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 33
บทที่ 4 34
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 34
4.1 การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี 34
4.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 37
4.3 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน 40
4.4 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 42
4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 44
บทที่ 5 48
สรุปผลการทดลอง 48

บรรณานุกรม..... 49

ประวัติผู้เขียน..... 65



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 สารเคมีสำหรับการทดลอง 27
ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากชานอ้อย 36
ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชานอ้อย 39
ตารางที่ 4.3 สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน 41
ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารสกัดจากชานอ้อย 43
ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดจากชานอ้อยเมื่อตรวจสอบด้วย HPLC 47

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ 7

รูปที่ 2.2 โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติบางชนิด 8

รูปที่ 2.3 โครงสร้างเคมีของแคโรทีนอยด์บางชนิด (Lessin & Schwartz, 2002) 11

รูปที่ 2.4 โครงสร้างเคมีของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด (Ozdal et al., 2013) 15

รูปที่ 2.5 โครงสร้างเคมีของไฟโตสเตอรอล (Mohammed, Klimoski, & Rentsch, 2000) 16

รูปที่ 2.6 โครงสร้างเคมีอะไกลโคนของซาโปนินส์บางชนิด (Sparg, Light, & Van Staden, 2004) 17

รูปที่ 2.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาและโครงสร้างเคมีของ ABTS 21

รูปที่ 2.8 โครงสร้างเคมีของอนุมูล DPPH 22

รูปที่ 2.9 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ FRAP 23

บทที่ 1
บทนำ

ในบทนี้จะกล่าวถึงหัวข้อที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

1.1 หลักการและเหตุผล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.1 หลักการและเหตุผล

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตจะมีการสะสมอนุมูลอิสระของออกซิเจนซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ภายในร่างกาย อีกทั้งยังเกิดจากสภาวะแวดล้อมภายนอกร่างกาย ได้แก่ แสงแดด สารเคมี ควันบุหรี่ สารปรุงแต่งในอาหาร และสิ่งปนเปื้อนในอากาศ เป็นต้น สารออกซิไดซ์แรงสูง ROS มีความว่องไวสูงสุดและสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้โมเลกุลนั้นขาดอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระ (El-Beltagi and Mohamed, 2013) ซึ่งร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระอยู่แล้วแต่ถ้าอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้จะก่อให้เกิดอันตรายเนื่องจากสมบัติของอนุมูลอิสระดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ ส่งผลต่ออวัยวะต่าง ๆ จนนำไปสู่โรคเสื่อม ได้แก่ การเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันในร่างกาย ที่มักอยู่ในรูปของไลโพโปรตีนชนิด LDL จะก่อให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (coronary thrombosis) ภาวะเครียดออกซิเดชัน ก่อให้เกิดการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนเกิดความเสียหาย และ DNA เกิดการกลายพันธุ์ (Meng et al., 2012) เหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ หลอดเลือดตีบ และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบสมอง (Poudel et al., 2008; Antoniolli et al., 2015) เป็นต้น

การศึกษาวิจัยสารพฤกษเคมี (phytochemical) ได้รับความสนใจอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาและมีรายงานการศึกษาจำนวนมาก โดยพบว่าสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พืชสร้างขึ้น พบมากในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากพืช ตัวอย่างเช่น ฟีนอล (phenols) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins) หรือสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) ตัวอย่างเช่น แคโรทีนอยด์ (carotenoids) (Oroian and Escriche, 2015) นอกจากนี้ ยังมีรายงาน การวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมีเหล่านี้จำนวนมากเช่นกัน

สารจากธรรมชาติมีบทบาทสำคัญและได้รับความสนใจเพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชวิทยามากขึ้นในช่วงเวลาสิบปีที่ผ่านมา เนื่องจากมนุษย์มีความสนใจในสุขภาพและความงามมากขึ้น การศึกษาวิจัยเพื่อหาสารจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีของร่างกาย จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะ สารพฤกษเคมี (Antoniolli et al., 2015; Medini et al., 2015) บทบาทของสารพฤกษเคมีมีหลากหลาย บางชนิดเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (enzyme stimulants) (Pradeep and Sreerama, 2015) ลดความเสี่ยงโรคเบาหวานชนิดที่ II (anti-diabetes type II) (Youl et al., 2010) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อไวรัส ช่วยลดอาการของโรคภูมิแพ้ และออกฤทธิ์แบบ physical action โดยการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อป้องกันการเกาะติดของเชื้อโรค (Pham-Huy et al., 2008) โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันเซลล์และทำหน้าที่เป็นสารต้านมะเร็งในสิ่งมีชีวิต (Li et al., 2015)

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) อยู่ในวงศ์เดียวกับหญ้าและธัญพืช จัดเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจสำคัญของไทย และเป็นสินค้าอุตสาหกรรมลำดับต้น ๆ ของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากลำต้นของอ้อยมีปริมาณซูโครสประมาณ ร้อยละ 17-35 จึงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลอย่างแพร่หลายซึ่งสังเกตได้จากโรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อยมีหลายจังหวัดในประเทศไทยนอกจากนี้อ้อยยังเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง และยังมีรายงานการค้นพบสารพฤกษเคมีหลายชนิดในอ้อย อีกทั้งในส่วนต่าง ๆ ของอ้อยยังพบว่ามีปริมาณสารเหล่านี้ไม่เท่ากันและในพันธุ์ที่ต่างกันก็จะพบแตกต่างกันด้วย (Feng et al., 2014) สารเหล่านี้มีบทบาทที่สำคัญแตกต่างกัน เช่น ฟีนอลิก (phenolic) ฟลาโวนอยด์ (flavonoide) และไฟโตสเตอรอล (phytosterols) มีบทบาทสำคัญในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ต้านการ-อักเสบ (anti-inflammatory) ต้านการกลายพันธุ์ (antimutation) และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินและที่น่าสนใจมากกว่านี้ คือจะพบสารในกลุ่มไฟโตสเตอรอล ได้แก่ ไตรเทอร์พีนอยด์, (triterpenoids), สติกแมสเทอรอล (stigmasterol), เบตา-ไซโตสเตอรอล (β-sitosterol) และสเตอรอยด์ (steroids) ที่มีส่วนช่วยลดระดับคอลเรสเตอรอล (cholesterol) และลดระดับไขมันความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein; LDL) ในเลือดด้วย (Plat et al., 2001; Bhore et al. (2012) และพบว่าในอ้อยสายพันธุ์ที่ต่างกันจะพบปริมาณสารพฤกษเคมีรวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน (Feng, Luo, Zhang, Zhong, & Lu, 2014)

อ้อยที่ปลูกในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์เพื่อส่งขายโรงงานผลิตน้ำตาลทำให้แต่ละปีจะมีปริมาณลำต้นอ้อยที่ผ่านการรีดน้ำตาล หรือที่เรียกว่า ชานอ้อย (bagasse) ปริมาณมากที่ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นได้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะตรวจสอบหาสารพฤกษเคมีในชานอ้อยดังกล่าว เนื่องจากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารพฤกษเคมีที่เปลือกอ้อยมีปริมาณสูง รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและไทโรซิเนส เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปต่อยอดงานวิจัยที่จะช่วยเพิ่มมูลค่าของชานอ้อยที่ถือเป็นสิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำตาลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อสกัดสารพฤกษเคมีจากชานอ้อยด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

1.2.2 เพื่อตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและไทโรซิเนส ของสารสกัดจากชานอ้อย

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ต่างกัน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการสกัดชานอ้อยด้วยเอทานอล ตรวจสอบปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม ไตรเทอร์ฟีนอยด์รวม สเตอรอลรวมและตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ ฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS, ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะ (FRAP) และฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและไทโรซิเนส จากนั้นหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชานอ้อย

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

การสกัด	กระบวนการหมักชานอ้อยด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกสารพฤกษเคมีออกจากชานอ้อย
ร้อยละการยับยั้ง	ร้อยละของอนุมูลอิสระและเอนไซม์ที่ถูกจับด้วยสารสกัดจากชานอ้อย
สหสัมพันธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชานอ้อย
สารสกัดหยาบ	สารที่ได้จากการแช่อ้อยในเอทานอลและผ่านการกำจัดเอทานอลออกแล้ว
ชานอ้อย	ส่วนของลำต้นอ้อยที่ผ่านการคั้นเอาน้ำออกแล้ว

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

ในบทนี้จะกล่าวถึงหัวข้อที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

2.1 อนุมูลอิสระ

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

2.3 สารพฤกษเคมี

2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมี

2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.6 อ้อย

2.7 การศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในอ้อย

2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอม โมเลกุลหรือไอออน ซึ่งมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดไม่ครบคู่ เนื่องจากขาดอิเล็กตรอนไปหนึ่งตัว จึงทำให้โมเลกุลไม่มีความเสถียรและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้ (El-Beltagi & Mohamed, 2013) สามารถแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงและสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกายได้ เช่น ไขมัน โปรตีน หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้โมเลกุลนั้นขาดอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระ ในลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งสภาวะที่อนุมูลอิสระมีมากเกินไปอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย เรียกภาวะนี้ว่า ภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเสื่อมหลายชนิด (Meng, Fang, Qin, Zhuang, & Zhang, 2012) สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ แสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $R^{\bullet}$ อนุมูล $R^{-\bullet}$

ชนิดของอนุมูลอิสระที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) Reactive oxygen species (ROS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมออกซิเจน แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ กลุ่มที่เป็นอนุมูล (radicals) เช่น superoxide anion radical ($O_2^{-\bullet}$), hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$) และกลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูล (non-radicals) แต่มีสมบัติในการออกซิไดซ์หรือถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระได้ง่าย เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), singlet oxygen (O_2) และ ozone (O_3) เป็นต้น

2) Reactive nitrogen species (RNS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจน เช่น nitric oxide radical ($NO^{\bullet}$), nitrogen dioxide radical ($NO_2^{\bullet}$) และ nitrate ($NO_3^{\bullet}$) เป็นต้น

3) Reactive chlorine species (RCS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมคลอรีน เช่น hypochlorous acid (HOCl), chlorine dioxide (ClO_2), Chlorine gas (Cl_2) และ nitryl chloride (NO_2Cl) เป็นต้น

4) Reactive bromine species (RBS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมโบรมีน เช่น hypobromous (HOBr) และ bromine gas (Br_2) เป็นต้น

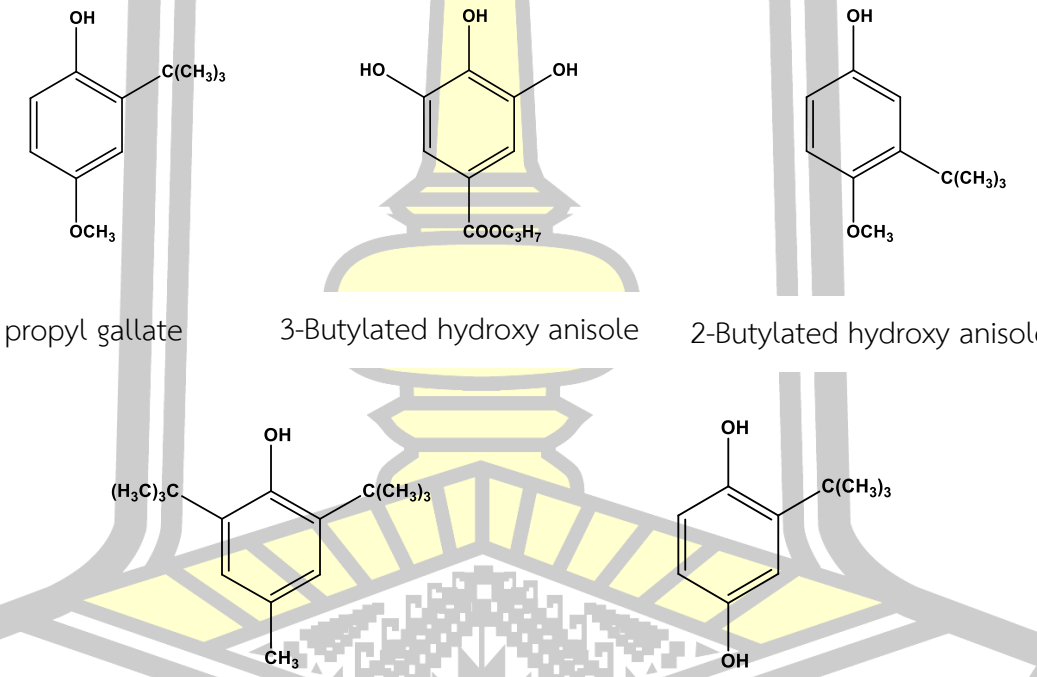
สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตจะมีการสะสมอนุมูลอิสระของออกซิเจน ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ภายในร่างกาย อีกทั้งยังเกิดจากสภาวะแวดล้อมภายนอกร่างกาย ได้แก่ แสงแดด สารเคมี ควันบุหรี่ สารปรุงแต่งในอาหาร และสิ่งปนเปื้อนในอากาศ เป็นต้น สารออกซิไดซ์แรงสูง ROS มีความว่องไวสูงสุดและสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้โมเลกุลนั้นขาดอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระ (Meng et al., 2012; (El-Beltagi & Mohamed, 2013) ซึ่งร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระอยู่แล้ว แต่ถ้าอนุมูล-อิสระมีมากเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้จะก่อให้เกิดอันตรายเนื่องจากสมบัติของอนุมูลอิสระดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ส่งผลต่ออวัยวะต่าง ๆ จนนำไปสู่โรคเสื่อม ได้แก่ การเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันในร่างกายที่มักอยู่ในรูปของไลโพโปรตีนชนิด LDL จะก่อให้เกิดโรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจ (heart disease) โรคหลอดเลือดแดงเข็ง (atherosclerosis) และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (coronary thrombosis) ดังนั้น ภาวะเครียดออกซิเดชัน ก่อให้เกิดการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนเกิดความเสียหาย และ DNA เกิดการกลายพันธุ์ (Meng et al., 2012) เหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ หลอดเลือดตีบ และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบสมอง (Poudel, Tamura, Kataoka, & Mochioka, 2008); Antoniolli, Fontana, Piccoli, & Bottini, 2015) เป็นต้น ดังนั้น เมื่อร่างกายไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระส่วนเกินได้หมดจึงจำเป็นต้องพึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก เพื่อยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระหรือยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระไม่ให้ดำเนินต่อไป (Dias et al., 2015) มีปริมาณน้อยก็สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ ปกติในร่างกายจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติเพื่อทำหน้าที่ป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ซึ่งมีทั้งเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ (Meng et al., 2012) สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้อยู่ในรูปที่เกิดปฏิกิริยาภายในร่างกายน้อยลงหรือไม่เกิดเลย (Chaudière & Ferrari-Iliou, 1999) สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น โปรตีน จำพวกแทรนส์เฟอร์ริน (transferrin) แล็กโตเฟอริน (lactoferrin) อัลบูมิน (albumin) เซอรูโลพลาส มิน (ceruloplasmin) บิลิรูบิน (bilirubin) และยูเรต (urate) สามารถป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระได้โดยตรง เมื่ออนุมูลอิสระมีมากกว่าร่างกายจะกำจัดได้อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย จึงต้องหาสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งอื่นมาเพื่อยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและไม่ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบมาก คือ พืช โดยเฉพาะ ผัก ผลไม้ และสมุนไพร สารประกอบในสารสกัดจากพืชเหล่านี้มีชื่อเฉพาะว่า “พฤกษเคมี” (Dias et al., 2015) สารพฤกษ-เคมีประกอบด้วยสารจำพวกวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน (Oroian & Escriche, 2015) และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มพอลิฟีนอล เช่น กรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีนอย่างน้อย 1 หมู่ขึ้นไป (Antoniolli et al., 2015) หมู่ฟังก์ชันนี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ ได้แก่ ดักจับอนุมูลอิสระกับไอออนโลหะเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) และลดความเข้มข้นของออกซิเจนที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (reducing localized O_2 concentrations) (Brewer, 2011; Maqsood, Benjakul, Abushelaibi, & Alam, 2014)

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ประเภท ดังนี้

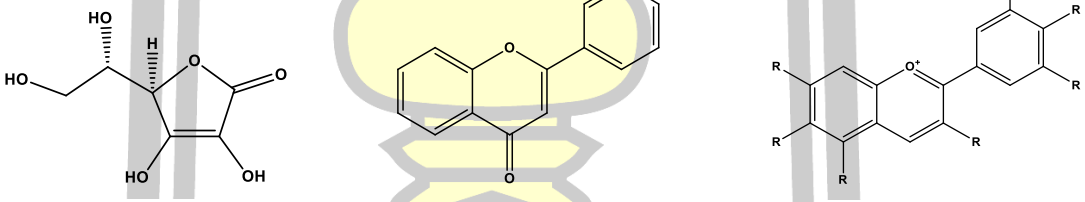
1) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ขนมและอุตสาหกรรมน้ำมันพืช เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา-ออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang, Martinson, & Liu, 2009) สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดที่รู้จักกันโดยทั่วไป ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate - hydroxyanisole, (butylated hydroxytoluene; BHT) , tertiary butylhydroquinone โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2.1



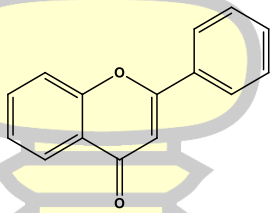
รูปที่ 2.1 โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

2) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันเนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช

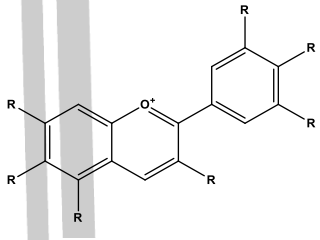
โดยจะพบปริมาณมากที่สุดในพืช ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากพืชจะมีชื่อเรียกเฉพาะว่า สารพฤกษเคมี (phytochemicals) มีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบตาแคโรทีนและสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก (Hwang, Chen, Nines, Shin, & Stoner, 2006) โดยเฉพาะกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone), แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบพอลิฟีนอลที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) (Sánchez-Moreno, Jiménez-Escrig, & Saura-Calixto, 2000) สารประกอบกลุ่มพอลิฟีนอล ซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และในสิ่งมีชีวิต รูปที่ 2.2 โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติบางชนิด



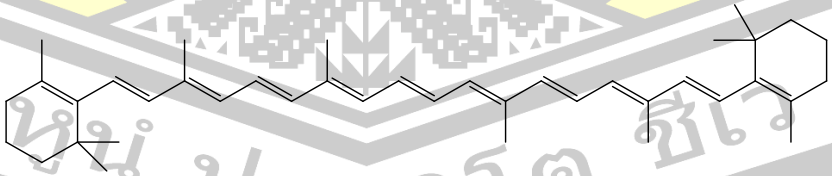
Vitamin C



Flavonoid



Anthocyanin



Vitamin E

รูปที่ 2.2 โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติบางชนิด

2.3 สารพฤกษเคมี

2.3.1 นิยามสารพฤกษเคมี

คำว่า “สารพฤกษเคมี” หรือ “phytochemicals” มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกโบราณ คำว่า “phyto” หมายถึง “พืช” ส่วนคำว่า “chemicals” หมายถึง “สารเคมี” ดังนั้น คำว่า “phytochemicals” คือ อินทรียสารจากพืช หรือสารประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืช

Onyeka and Nwambekwe (2007) ได้ให้ความหมายของ “สารพฤกษเคมี” ว่ามาจาก พืช (plant) + สารเคมี (chemicals) = สารเคมีที่ได้จากพืช (plant chemicals) สารพฤกษเคมีเป็นสารที่พบในผัก ผลไม้ พืชตระกูลถั่ว และธัญพืช สารกลุ่มนี้เป็นสารที่ทำให้พืชผัก มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤกษเคมีเป็นสารประกอบที่พบเฉพาะในพืชที่ไม่ใช่สารอาหารอีกทั้งมีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อช่วยลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่าง ๆ

Doughari et al. (2009) นิยามความหมายของคำว่า “สารพฤกษเคมี” คือ สารประกอบจากพืชที่ไม่ใช่สารอาหาร ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พบได้ในผัก ผลไม้ ธัญพืช และอาหารจากพืชอื่น ๆ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้มีฤทธิ์ช่วยต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และสารพิษ ช่วยลดความเสี่ยงของโรคร้ายแรงต่าง ๆ ได้

Chede (2013) กล่าวว่า “สารพฤกษเคมี” เป็นสารประกอบทางเคมีที่พบในพืช และไม่ใช่สารอาหาร เป็นสารที่มีคุณสมบัติป้องกันโรค นอกจากนี้ สารพฤกษเคมีสามารถใช้อธิบายความหลากหลายทางชีวภาพของพืชได้ เช่น การทำให้พืชมีสี กลิ่น รสชาติ และการป้องกันศัตรูพืช อีกทั้งยังมีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ เช่น ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และ โรคหลอดเลือด เป็นต้น

โดยสรุป คำว่า สารพฤกษเคมี หมายถึง สารประกอบตามธรรมชาติที่พืชสร้างขึ้นและเป็นสารเคมีที่ พบได้ในผัก ผลไม้ ธัญพืช และอาหารอื่น ๆ จากพืช สารกลุ่มนี้เป็นสารที่ทำให้พืชมีสี กลิ่น และรส เป็นลักษณะเฉพาะตัว อีกทั้งมีฤทธิ์ต่อต้าน และป้องกันโรคบางชนิดได้ดี

สารประกอบเคมีในพืชมีความหลากหลายของโครงสร้างและหน้าที่ในสิ่งมีชีวิต การศึกษาให้ลึกลงไปถึงวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเหล่านี้ จึงมีความเกี่ยวข้องกับสารตั้งต้น ตัวเร่งปฏิกิริยา และนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดกระบวนการ การสังเคราะห์จึงมีความสำคัญในการนำสารเหล่านี้มาพัฒนาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุดการแบ่งประเภทของสารที่มีอยู่ในธรรมชาติอาจทำได้ทั้งในแง่ของความคล้ายคลึงในโครงสร้างหรือการทำหน้าที่ของสาร แต่การแบ่งประเภทของสารประกอบเคมีในพืชขั้นต้น สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)

1) เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites)

เป็นสารประกอบที่อยู่ในพืชชั้นสูงทั่วไปมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การหายใจ การเจริญเติบโต และพัฒนาการของพืช (Dewick et al., 2002) ได้แก่ สารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดอะมิโน โปรตีน รวมถึงสารที่จำเป็น ต่อการดำรงชีวิตของพืช สารเหล่านี้จะเป็นสารตั้งต้น ในการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) หรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อไป

2) เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)

เป็นสารพฤกษเคมีที่พบในพืชชั้นสูง ซึ่งพืชจะมีการสะสมสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำ ๆ ไว้ในส่วนต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น มีลักษณะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลุ่มใหญ่และโมเลกุลมีความซับซ้อน โดยได้จากการเปลี่ยนสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ ด้วยกระบวนการชีวสังเคราะห์แล้วเกิดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีลักษณะพิเศษแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช สารกลุ่มนี้พบในพืชบางชนิดเท่านั้นและไม่มีความจำเป็น ในการดำรงชีวิตของพืช ซึ่งในกรณีที่ขาดสารกลุ่มนี้ไปจะไม่ทำให้พืชตายทันทีแต่จะทำให้การอยู่รอดในระยะยาวของพืชต่ำลง บทบาทสำคัญของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิต่อพืช ได้แก่ เป็นสารที่ใช้ในกระบวนการป้องกันตัวเอง (self-defense) จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เช่น ป้องกันตัวเองจากสัตว์กินพืช จำพวกแมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีเปลือกแข็งหุ้ม และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น อีกทั้งยังช่วยป้องกันโรคจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเห็ดรา (Nisa et al., 2015) และป้องกันโรคจากไวรัส นอกจากนี้ สารกลุ่มนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการดึงดูดแมลงเพื่อช่วยถ่ายละอองเรณูและการส่งสัญญาณของโมเลกุลในรูปแบบการตรึงไนโตรเจนที่ปมรากพืชตระกูลถั่ว สารพฤกษเคมี ชนิดเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ (i) flavonoids และ allied phenolic และ polyphenolic compounds, (ii) terpenoids และ (iii) nitrogen-containing alkaloids และ sulphur-containing compounds ในวิถีการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ในพืชที่รู้จักกันดี คือ วิถีชิคิเมท

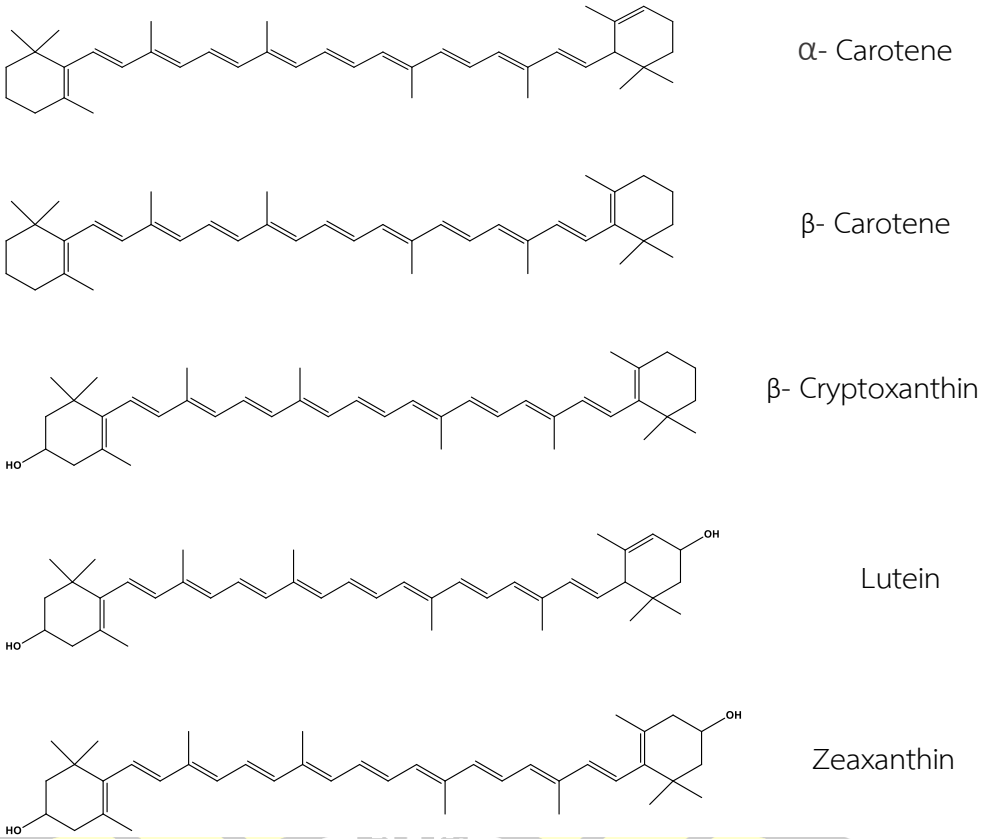
2.3.2 ประเภทของสารพฤกษเคมี

สารพฤกษเคมีแบ่งออกเป็นหลายประเภทตามลักษณะโครงสร้างเคมีและจำนวนคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

2.3.2.1 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นกลุ่มย่อยของเทอร์พีนอยด์ มีประโยชน์ในการป้องกันโรคอ้วนและต่อต้านการอักเสบ แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง สีส้มและสีแดง อยู่ในกลุ่มไฮโดรคาร์บอน (carotenes) และอนุพันธ์ของออกซิเจน (xanthophylls) พบได้ทั่วไปใน

สิ่งมีชีวิต เช่น พืชชั้นสูง สาหร่าย สัตว์และจุลินทรีย์ แคโรทีนอยด์ที่มีปริมาณมากที่สุดในอาหาร คือ α-carotene ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็น vitamin A เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายและ β-carotene ที่ออกฤทธิ์ช่วยยับยั้งการอักเสบของยีนใน lipopolysaccharide-stimulated macrophages แคโรทีนอยด์ในอาหารธรรมชาติมีประมาณ 600 ชนิด ที่พบมากมี 6 ชนิด คือ แอลฟาแคโรทีน (alpha-carotene), บีตาแคโรทีน (beta-carotene), บีตาคริพโตแซนทิน (beta-cryptoxanthin), ไลโคพีน (lycopene), ลูทีน (lutein) และ ซีแซนทีน (zeaxanthin) รูปที่ 2.3 โครงสร้างเคมีของแคโรทีนอยด์บางชนิด



รูปที่ 2.3 โครงสร้างเคมีของแคโรทีนอยด์บางชนิด (Lessin & Schwartz, 2002)

2.3.2.2 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารพฤกษเคมีกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบในพืช โดยมีโครงสร้างประกอบด้วย หมู่ไฮดรอกซีเกาะอยู่กับวงแหวนเบนซีน เป็นกลุ่มสารทุติยภูมิ มีโครงสร้างหลากหลายและแตกต่างกันส่วนใหญ่จะพบในรูปอนุพันธ์และไอโซเมอร์ของฟลาโวนส์ ไอโซฟลาโวนส์ ฟลาโวนอยด์ คาร์ทิชิน และกรดฟีนอลิก ตั้งแต่โมเลกุลไม่ซับซ้อน เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ จนถึงสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ซับซ้อน คือ พอลิฟีนอล เช่น แทนนินส์ สารเหล่านี้มี

ฤทธิ์หลายอย่าง เช่น ต้านการเกิดสภาวะออกซิเดชัน ป้องกันการเกิดโรคมะเร็งต่าง ๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งตับ เป็นต้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางยา โดยเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านภาวะการอักเสบต่าง ๆ และช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกัน สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ และโครงสร้างมีความเสถียร สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และ low-density lipoprotein (LDL) ป้องกันเนื้อเยื่อและดีเอ็นเอจากการถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก แสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.3.2.2.1 กลุ่มกรดฟีนอลิก

เป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืช สามารถแบ่งกรดฟีนอลิกได้ 2 ชนิด ได้แก่

1) กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) เป็นกรดฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่สุดพบทั่วไปในพืช กรดฟีนอลิกที่พบมาก ได้แก่ *p*-coumaric, caffeic, ferulic และ sinapic acids โดยปกติเกิดขึ้นจากหลาย ๆ รูปแบบ เช่น เกิดจากการย่อยของเอนไซม์ หรือการเชื่อมกันของเอสเทอร์ของ hydroxy acids ตัวอย่างเช่น quinic, shikimic และ tartaric acid

1.1) กรดพาราคูมาลิก (*p*-coumaric acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีของกรดซินนามิก มีลักษณะเป็นผลึกแข็งสีขาวละลายในน้ำได้แต่ละลายได้ดีในเอธานอลและไดเอธิลเอสเทอร์ กรดนี้พบได้ 3 ไอโซเมอร์ คือ *o*-coumaric acid, *m*-coumaric acid และ *p*-coumaric acid โดยแตกต่างกันที่ตำแหน่งไฮดรอกซี *p*-coumaric acid เป็นไอโซเมอร์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ เช่น ถั่วลิสง แครอท พริกสีเขียว สตรอเบอร์รี สับปะรด มะเขือเทศ และกระเทียม ฤทธิ์ทางชีวภาพของกรดนี้คือ สามารถต้านการออกซิเดชันของ low-density lipoprotein (LDL) และเชื่อว่าลดภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร

1.2) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น จัดเป็นกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งอาจอยู่ในรูปกรดอิสระหรือจับกันเป็นโอลิโกเมอร์ หรือเชื่อมด้วยสารประกอบอินทรีย์ในรูปของกลูโคไซด์ และเอสเทอร์ กรดคาเฟอิกพบในผลไม้ ผัก เครื่องเทศ และเครื่องดื่ม กรดคาเฟอิกฟีนิลเอสเทอร์ใช้ประโยชน์ทางยา โดยเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านภาวการณ์อักเสบ และมีคุณสมบัติในการช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกัน

1.3) กรดวานิลิก (vanillic acid) เป็นสารประกอบหลักของ biovanillin acid กรดนี้ประกอบด้วยหมู่อัลดีไฮด์และฟีนอลิก กรดวานิลิกถูกสร้างขึ้นโดยพืช เช่น ฝักวานิลลา และสามารถสังเคราะห์ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อใช้เป็นสารให้กลิ่นในลูกกวาด อาหารและเครื่องดื่ม กรดวานิลิกมีคุณสมบัติในการต้านสารก่อมะเร็ง โดยลดจำนวนเซลล์มะเร็งในลำไส้เล็ก

สามารถต้านออกซิเดชัน ป้องกันเซลล์จากการทำลายของ H_2O_2 ป้องกันเซลล์ไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย ช่วยให้การใช้ยาต้านมะเร็งมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2) กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) มีโครงสร้างโดยทั่วไป คือ C_6-C_1 เป็นอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก ตัวอย่างกรด เช่น กรดซาลิไซลิก และกรดแกลลิกซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ อยู่ในโมเลกุล

2.1) กรดเอลลาจิก (ellagic acid) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 4 วง และเป็นอนุพันธ์ไดเมอร์ของกรดกาลิก เมื่อบริสุทธิ์จะเป็นผลึกแข็งสีครีมถึงขาวอมเหลือง กรดนี้พบในไวน์แดงจากผลไม้ เช่น องุ่น และผลไม้ตระกูลเบอร์รี ได้แก่ ราสเบอร์รี สตรอเบอร์รี แบกเบอร์รี แครนเบอร์รี ทับทิม เกาลัดบางชนิด และมันฮ่อ พบกรดนี้มากที่สุดในผลแรสเบอร์รี กรดเอลลาจิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย กล่าวคือเป็นสารต้านออกซิเดชัน สามารถต้านไวรัส กำจัดอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดการกลายพันธุ์ ต้านการสร้างหรือเกิดเนื้อเยื่อมากผิดปกติ ต้านภาวะอักเสบและต้านมะเร็ง และมีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งตับ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการต้านไวรัสและแบคทีเรียอีกด้วย เช่นคุณสมบัติในการต้านเชื้อพลาสโมเดียมในพืช กรดนี้จะช่วยในการต้านการรุกรานจากเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันยาฆ่าแมลง

2.2) กรดแกลลิก (gallic acid) เมื่อบริสุทธิ์จะเป็นผงผลึกอินทรีย์ ไม่มีสี พบมากในพืชหลายชนิด ได้แก่ สมอ องุ่น ชา และเปลือกต้นโอ๊ก มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อราและต้านเชื้อไวรัส นอกจกานี้ยังสามารถต้านทานการเกิดออกซิเดชันไม่ให้เซลล์ถูกทำลาย และยังสามารถต้านเซลล์มะเร็งไม่ให้มีอันตรายต่อเซลล์ได้ สามารถใช้ในการป้องกันสาเหตุของเลือดไหลออกที่ลำไส้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการรักษาภาวะที่กระเพาะปัสสาวะมีอัลบูมินสูง โรคเบาหวาน บางครั้งใช้เป็นครีมรักษาโรคเรื้อนและภาวะเลือดออกง่าย

2.3.2.2.2 กลุ่มฟลาโวนอยด์

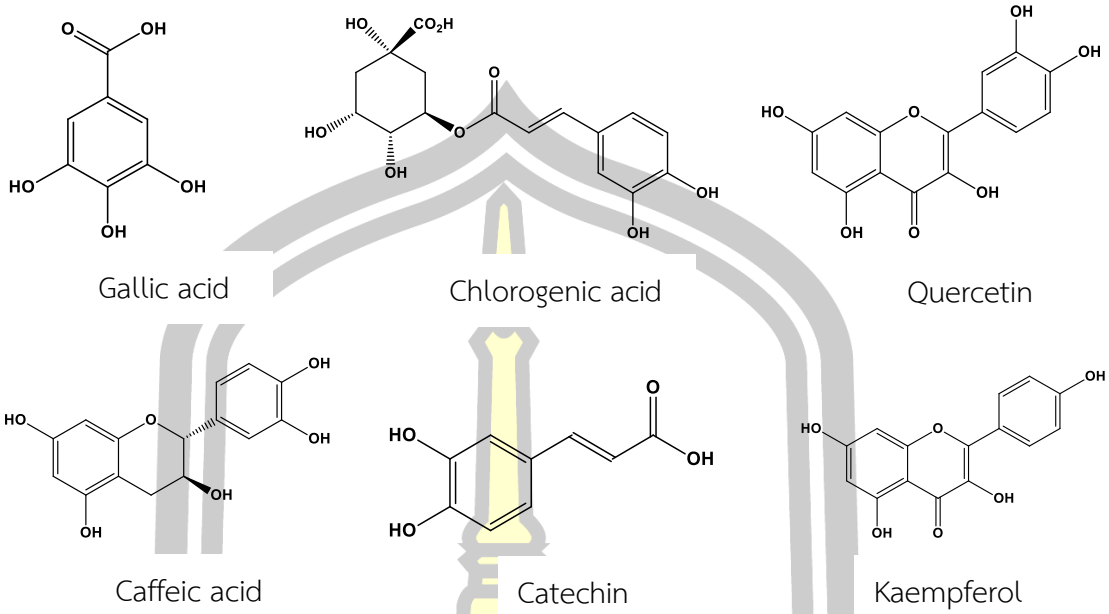
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารพอลิฟีนอลที่มีความสำคัญและมีปริมาณมากในพืชและยังพบว่ามีการศึกษาอย่างแพร่หลาย (Ozdal, Capanoglu, & Altay, 2013) พบได้ทั่วไปในอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช เช่น ผัก และผลไม้ ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลักฟลาโวนตรงนิวเคลียส มีสูตรโมเลกุล คือ C_{15} (C_6-C_3-C_6) โดยมีวงแหวน A และ B (phenyl ring) จับกับไพแรนหรือไพโรน (C) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ ring C ทำให้มีการแยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ และการเกิด hydroxylation ที่ ring A และB ทำให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้น ๆ และจากรายงานการศึกษาระบุว่า สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีโดยกลไกการดักจับอนุมูลอิสระ ปัจจุบันมีการค้นพบฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติ มากกว่า 4,000 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในรูป

ไกลโคไซด์ และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมาก เช่น quercetin, kaempferol และ quercetin มีมากเกือบ 70% ของสารที่พบในพืช ส่วนสารกลุ่มอื่น ได้แก่ flavones, dihydroflavons, catechin, flavans, flavonols, anthocyanidins, calchones, proanthocyanidins, และ leucoanthocyanidins ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ คือ

1) แอนโธไซยานินส์ (anthocyanins) ซึ่งจะพบในรูปของอนุพันธ์ต่าง ๆ พบมากในสีของดอกไม้ ผัก และผลไม้ เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันในร่างกาย เนื่องจากในโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก เป็นสารมีฤทธิ์ที่พบในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น bilberry จากการศึกษาพบว่าแอนโธไซยานินส์มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง และมีจำนวนมากที่สุดในบรรดาสารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีประมาณ 150 ชนิด จากประมาณ 4,000 ชนิด ที่สามารถจำแนกได้ จากการทดสอบความสามารถในการป้องกันออกซิเดชันของผลไม้ตระกูลเบอร์รีหลายสายพันธุ์ พบว่าแบกเบอร์รีมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าผลไม้อื่น ๆ แอนโธไซยานินส์ที่พบในกะหล่ำปลีแดง สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ดี แอนโธไซยานินส์อีกชนิดหนึ่ง คือ pelargonidin พบว่าสามารถป้องกันกรดอะมิโนชนิดไธโรซินจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเปอร์รอกซีไนไตรท์ได้ ในมะเขือม่วงมีอนุพันธ์ของแอนโธไซยานินส์ที่เรียกว่า nasunin จะไปจับกับอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายในร่างกาย นอกจากนี้แอนโธไซยานินส์ ยังมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ สามารถป้องกันเส้นเลือดใหญ่และเส้นเลือดฝอยจากการทำลายจากสภาวะต่าง ๆ จากน้ำตาลในกระแสโลหิตในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน

2) แอนโธแซนทินส์ (anthoxanthins) เป็นกลุ่มสารที่ไม่มีสี ประกอบด้วยกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนส์ ฟลาแวนส์ ไอโซฟลาโวส์ ฟลาโวนอลส์ ฟลาวานอลส์ และอนุพันธ์ที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์

2.1 ควอซิติน (quercetin) เป็นสารฟลาโวนอยด์ที่มีมากที่สุด โครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 3 วง และมีหมู่ไฮดรอกซี 5 หมู่ ควอซิตินในธรรมชาติพบในรูปของอะกลัยโคน ร่างกายมนุษย์สามารถดูดซับควอซิตินเข้ากระแสโลหิตได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ควอซิตินพบมากในอาหารทั่ว ๆ ไป เช่น แอปเปิ้ล ชา หัวหอม เกาลัด ผลไม้ตระกูลเบอร์รี กะหล่ำดอก ผักคะน้าและกะหล่ำปลี ควอซิตินมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์มากมาย เช่น ช่วยปรับปรุงระบบหมุนเวียนโลหิต ลดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง ต้านภาวะอักเสบและอาการแพ้ต่าง ๆ ซึ่งโครงสร้างเคมีของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด แสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 โครงสร้างเคมีของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด (Ozdal et al., 2013)

2.3.2.2.3 กลุ่มสติลบีนส์ (stilbenes)

สติลบีนส์สามารถจำแนกได้โดยดูจากโครงสร้างที่เป็นนิวเคลียส คือ 1,2-diphenylethylene และบริเวณหมู่ไฮดรอกซีที่วงแหวนจะถูกแทนที่ด้วยโมโนเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ สติลบีนส์ที่รู้จักกันดี คือ ทรานส์เรสเวอราโทรล (*trans*-resveratrol) ในธรรมชาติจะถูกสร้างขึ้นโดยพืช เพื่อป้องกันเชื้อโรค และแมลงกัดกิน และป้องกันแสงแดด จึงจัดเป็นสารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) จากการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และต้านการอักเสบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ดี

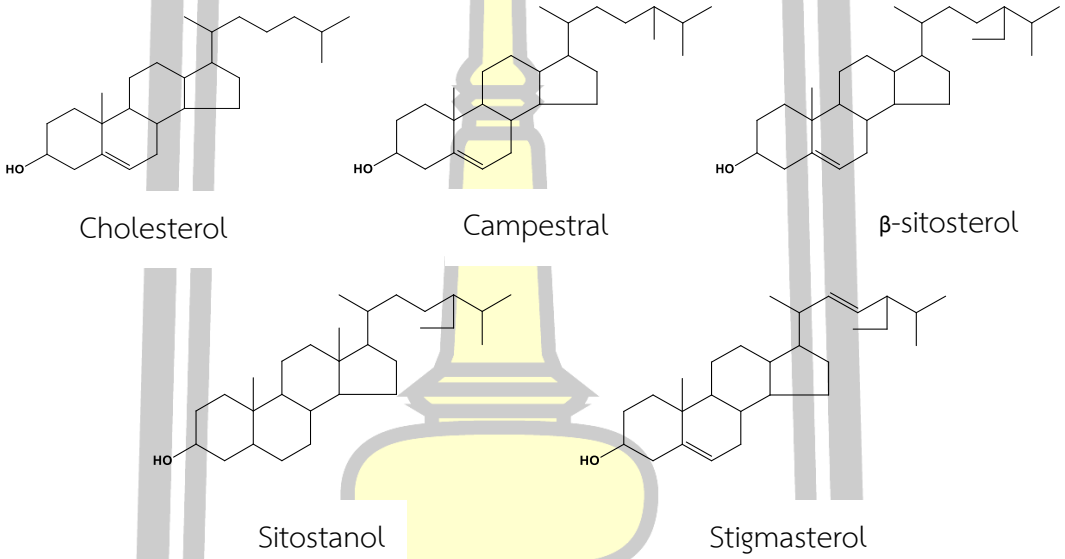
2.3.2.2.4 กลุ่มแทนนินส์

1) condensed tannins อาจเรียกว่า catechins tannins หรือ phobatannins เป็นสารโมเลกุลใหญ่และเป็นโพลิเมอร์ของสารประกอบฟีนอลิก มีสูตรโครงสร้างเกี่ยวพันกับสารประกอบฟลาโวนอยด์

2) hydrolysable tannins หรือเรียกว่า gallotannins เช่น gallic acid หรือ ellagic acid จับกันเป็นโมเลกุลใหญ่ เนื่องจากแทนนินส์สามารถตกตะกอนโปรตีนที่หนังสัตว์ได้ ใช้เป็นยาฝาดสมาน เช่น tannic acid ใช้เป็นส่วนผสมในตำหรับยาแก้ท้องเสีย หรือใช้กับบาดแผลที่ผิวหนังเพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น เช่น ใช้ในการรักษาแผลไฟไหม้

2.3.2.3 ไฟโตสเตอรอล

ไฟโตสเตอรอล (phytosterol) เป็นสารพฤกษเคมีที่คล้ายคลอเลสเตอรอลมาก โดยมีโครงสร้างแทบจะซ้อนทับกันได้ จึงมีส่วนช่วยลดระดับคอลเรสเทอรอล (cholesterol) และลดระดับไขมันความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein; LDL) ในเลือดด้วย ไฟโตสเตอรอลมีหลายชนิด เช่น campesterol, β-sitosterol, stigmasterol, lanosterol, ergosterol และ sitostanol (Georges, Sylvestre, Ruegger, & Bourgeois, 2006) รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างเคมีของไฟโต-สเตอรอล



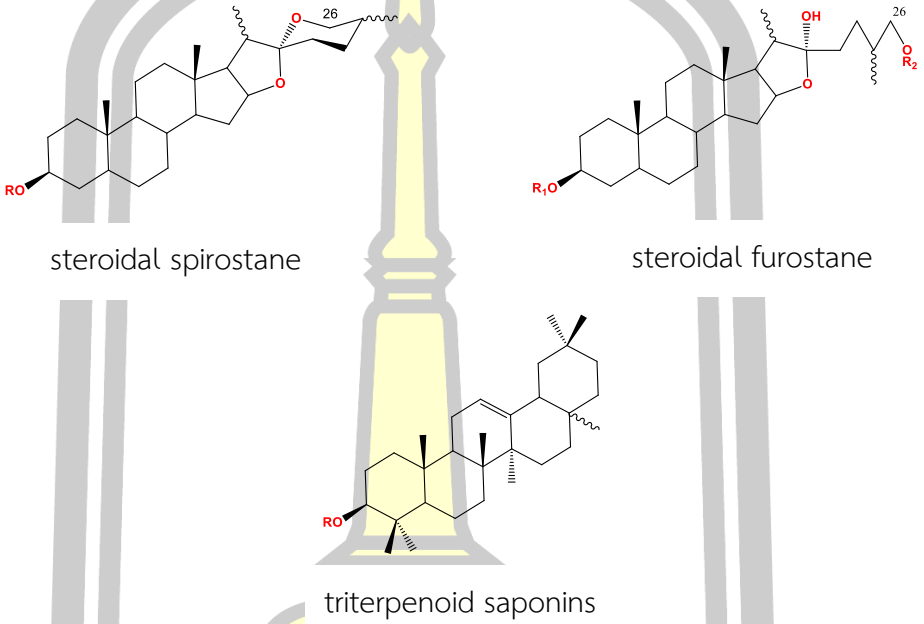
รูปที่ 2.5 โครงสร้างเคมีของไฟโตสเตอรอล (Mohammed, Klimoski, & Rentsch, 2000)

2.3.2.4 ซาโปนินส์

ซาโปนินส์ (saponins) เป็นสารทุติยภูมิอีกชนิดหนึ่งที่พบมากในพืชทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันหรือระบบการป้องกันพืชจากเชื้อโรคและแมลงกินพืช (Augustin, Kuzina, Andersen, & Bak, 2011) ซาโปนินส์ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ triterpenoid และ steroid glycosides ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างกันตามหน่วยของน้ำตาลที่อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ซาโปนินส์เป็นโมเลกุลที่ซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต (glycones) ที่ติดอยู่กับคอเลสเตอรอล ที่เรียกว่า aglycones หรือ sapogenins ในธรรมชาติพบ triterpenoid saponins มากที่สุดซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ oleanane เช่น oleanolic acid, hederagenin, glycyrrhetinic acid, presenegenin, quillaic acid หรือ echinocystic acid

ซาโปนินส์เมื่อแบ่งตามโครงสร้างของอะไกลโคนจะพบ non-steroidal saponins

มากที่สุดและส่วนใหญ่จะอยู่ในพืชดอกใบเลี้ยงคู่ (dicotyledonous angiosperms) และกลุ่ม steroidal saponins ที่ประกอบด้วย tetracyclic triterpenoids และ isoprene units ซึ่งจะพบในพืชดอกใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous angiosperms) และอาจจะมีอีกกลุ่มที่เรียกว่า steroidal amines ซึ่งเป็น steroidal alkaloids รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างเคมีอะไกลโคนของซาโปนินส์บางชนิด



รูปที่ 2.6 โครงสร้างเคมีอะไกลโคนของซาโปนินส์บางชนิด (Sparg, Light, & Van Staden, 2004)

2.3.2.5 ไตรเทอร์พีนอยด์

ไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) พบมากในพืชและสามารถพบได้ในเชื้อรา เฟิร์น พืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ สัตว์และสิ่งมีชีวิตในทะเล สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น ursolic, oleanolic acid, betulinic acid, celastrol และ lupeol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ป้องกันโรคเบาหวาน และมีแนวโน้มว่า สามารถต้านมะเร็งได้ สารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ มีฤทธิ์ต้าน-การอักเสบ ต้านจุลชีพ ต้านเชื้อไวรัส ป้องกันตับอักเสบ เสริมระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยปรับไขมันกลุ่มดี ลดระดับคอเลสเตอรอล ต้านการเสื่อมสลายของเส้นโลหิตแดงและต้านมะเร็ง (M.R. Patlolla & V. Rao, 2011) ปัจจุบัน มีการนำไตรเทอร์พีนอยด์ไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ อาหารเสริม เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สุขภาพ

2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมี

สารจากธรรมชาติมีบทบาทสำคัญและได้รับความสนใจเพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชวิทยามากขึ้นในช่วงเวลาสิบปีที่ผ่านมา (Wink, 2008) เนื่องจากมนุษย์มีความสนใจในสุขภาพและความงามมากขึ้น การศึกษาวิจัยเพื่อหาสารจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีของร่างกาย จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะ สารพฤกษเคมี (Antoniolli et al., 2015) (Medini et al., 2015) บทบาทของสารพฤกษเคมีมีหลากหลายบางชนิดเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (enzyme stimulants) (Yang et al., 2009; Forman, Davies, & Ursini, 2014; Pradeep & Sreerama, 2015) ลดความเสี่ยงโรคเบาหวานชนิดที่ II (anti-diabetes type II) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อไวรัส ช่วยลดอาการของโรคภูมิแพ้ (Yang et al., 2009) และออกฤทธิ์แบบ physical action โดยการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อป้องกันการเกาะติดของเชื้อโรค (Sharma, 2014) โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เพื่อป้องกันเซลล์และทำหน้าที่เป็นสารต้านมะเร็งในสิ่งมีชีวิต (Li, Jiang, Xu, & Gu, 2015)

2.4.1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การอักเสบเป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายต่อตัวกระตุ้นที่ทำให้ร่างกายบาดเจ็บ อาการอักเสบจะแสดงออกได้แตกต่างกันขึ้นกับชนิดและความรุนแรงของตัวกระตุ้นหรือระยะเวลา เมื่อร่างกายถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ นิวโทรฟิลส์ (neutrophils) เป็นเซลล์กลุ่มแรกที่จะถูกกระตุ้นให้ไปรวมตัวกันบริเวณที่มีการอักเสบเพื่อกำจัดสารหรือสิ่งแปลกปลอมที่ทำให้เกิดการอักเสบโดย นิวโทรฟิลส์จะกำจัดสิ่งเหล่านี้ด้วยการกลืนกินเข้าไปในเซลล์แล้วทำลายด้วย lysosomal enzyme และ superoxide radicals ที่ถูกปล่อยเข้าไปในฟาโกโซม (phagosome) (Lucas et al., 2010) นอกจากนี้ นิวโทรฟิลส์ ยังถูกกระตุ้นให้สร้างและหลั่งสารก่อการอักเสบ (inflammatory mediators) ออกมาอีกหลายชนิด อย่างไรก็ตาม สารที่ผลิตขึ้นนอกจากจะทำลายสิ่งแปลกปลอมแล้ว ยังทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อที่อยู่รอบ ๆ บริเวณที่มีการอักเสบได้ด้วย อาการที่พบ คือ ปวดบวมแดง ร้อน และถ้าอาการอักเสบนั้นเกิดเรื้อรังจะส่งผลให้อวัยวะที่เกิดการอักเสบสูญเสียหน้าที่ได้ หรือเหนี่ยวนำให้เกิดโรคต่อไปได้ (Romano, Cianci, Simiele, & Recchiuti, 2015) สารสกัดจากยางไม้ (gum resin) ในวงศ์ *Boswellia serata* ROXB. (*Burserceae*) ถูกนำมาใช้ในยาอายุรเวท (ayurvedic medicine) เพื่อต่อต้านและป้องกันการอักเสบ โดยใช้คาร์ราจีแนน (carrageenan) และเด็กซ์แทรน (dextran) เป็นตัวนำพา ในยางมะละกอจะพบ กรดบอสเวลิก (boswellic acid) ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ของ leukotriene B_4 ซึ่งเกิดจากกระบวนการ 5-lipoxygenase pathway ใน neutrophils

2.4.2 ฤทธิ์ต้านไวรัส

การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสถือว่าประสบความสำเร็จมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเอดส์ (AIDS) และโรคไวรัสตับอักเสบ (hepatitis) จากการทดลองในห้องปฏิบัติการสารประกอบของพืชมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส (Curini, Cravotto, Epifano, & Giannone, 2006) อย่างไรก็ตาม ยังมีหลายกรณีที่ฤทธิ์ของสารสกัดไม่เพียงพอสำหรับให้ผลทางการรักษาหรือผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นปัจจุบันใช้สารไตรเทอพีนอยด์ (triterpeniods) เป็นสารตัวเร่งในการยับยั้งเชื้อเอชไอวี (anti-HIV agents) และอนุพันธ์จากสารบีทูบินิก (betulinic acid) ซึ่งมีการดัดแปลงสายโซ่ที่ตำแหน่ง C-3 และ C-28 เพื่อยับยั้งการคัดลอกพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี และสาร baicalin ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ chemokine receptors แล้วสามารถยับยั้งเชื้อเอชไอวี (Mukhtar et al., 2008) พืชสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ของเชื้อไวรัส โดยใช้สารตั้งต้นโปรตีนสายยาวส่งเข้าไปจับกับอนุภาคโปรตีนของไวรัสเพื่อทำให้ไวรัสไม่สามารถแสดงออกได้สารพฤกษเคมีในพืชสมุนไพรจึงคาดว่าเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตยาต้านเชื้อไวรัสสำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (Yu et al., 2005)

2.4.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอกได้ นำไปสู่การป้องกันและรักษามะเร็งต่อไป (Shukla, Meeran, & Katiyar, 2014) สำหรับการรักษาโรคมะเร็ง ประกอบด้วยเซลล์เป้าหมายที่สำคัญคือ เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส (eukaryotic DNA topoisomerase) ไมโครทิวบูล (microtubule) และเอนไซม์อื่น ๆ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งวัฏจักรของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic cells) ระหว่างที่มีการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์ สำหรับการตรวจสอบสารที่ทีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งในห้องปฏิบัติการ (in vitro) จะทำการดัดแปลงกลไกของสารก่อมะเร็งโดยการยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม P (cytochrome P enzymes) หรือการเหนี่ยวนำเอนไซม์กำจัดสารพิษ ขั้นตอนที่สอง (detoxification enzymes phase II) เช่น การเหนี่ยวนำเอนไซม์ควิโนนรีดักเตส (quinone reductase) ในเซลล์ เซลล์เป้าหมายอื่น ได้แก่ เอนไซม์ที่ช่วยรักษาอาการอักเสบติดเชื้อ (pro-inflammatory enzymes) เช่น COX-2 หรือตัวกระตุ้นโปรตีนสำหรับการจำลองพันธุกรรม

2.4.4 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

เนื่องจากอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ไม่เสถียรสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างว่องไว อีกทั้งยังสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกายได้ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคร้ายแรงหลายชนิด ดังนั้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารพฤกษเคมีจึงได้รับความสนใจและมีรายงานว่าสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ โรคเสื่อมที่เกิดจากอนุมูลอิสระสามารถป้องกันได้ด้วย

สารต้านออกซิเดชัน เพื่อยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารพฤกษเคมีในกลุ่มพอลิฟีนอล เช่น กรดแกลลิก (gallic acid), คาเทชิน (catechin), เรสเวอราทรอล พบอยู่ในสารสกัดจากผักและผลไม้ จัดเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของพืช สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่ในการให้สี กลิ่นและรสชาติของพืช สารกลุ่มนี้จะเป็นโมเลกุลในการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมหน้าที่ทางกายภาพของพืช ปกป้องพืชจากแมลง แบคทีเรีย ไวรัส และเห็ดรา สารฟีนอลิกมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ (Li et al., 2015) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือด ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และช่วยต้านการอักเสบ เป็นต้น สารแอนโธไซยานิน มีคุณสมบัติ ในการต้านอนุมูลอิสระ และเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์มะเร็ง อะพอพโตซิส คือ การตายของเซลล์ที่มีแบบแผน (programmed cell death) ซึ่งเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการอะพอพโทซิสจะถูกกลืนกินอย่างรวดเร็วโดยฟาโกไซต์ (phagocyte) ซึ่งการกำจัดเซลล์ที่ตายจากอะพอพโทซิสนี้จะไม่มีการดึงดูดนิวโทรฟิลส์และไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาอักเสบ กระบวนการกำจัดเซลล์ที่ตายจากอะพอพโทซิสเป็นการตายตามปกติของเซลล์และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาและรักษาสมดุลของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงความผิดปกติของการควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิสจึงอาจทำให้เกิดโรคหรือพยาธิสภาพได้หลายอย่าง ได้แก่ อาจทำให้เกิดโรคมะเร็ง โรคต่อต้านภูมิคุ้มกันตัวเอง (autoimmune diseases) เป็นต้น อีกทั้งสารแอนโธไซยานินยังช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ รวมทั้งป้องกันการเกิดโทษจากกระบวนการออกซิเดชันกับรังสียูวีและยับยั้งการเหนี่ยวนำไดเอธิลโตรซามีน (diethylnitrosamine) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็งตับ ไอโซฟลาโวน (isoflavone) และอนุพันธ์มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ไอโซฟลาโวนมีคุณสมบัติคล้ายถั่วเหลือง คือ สามารถยับยั้งปัจจัยการทำงานของการจำลองพันธุกรรมและยีนที่มีความจำเป็นในการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) ฟลาวาน-3-ออล เช่น epigallo catechin gallate (EGCG) สามารถเหนี่ยวนำการตายแบบ อะพอพโทซิส และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเปลี่ยนแปลงตัวควบคุมการแสดงออกของโปรตีนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเปส (caspases) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพและมีความสำคัญในกลไกการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส หรือระงับปัจจัยที่ทำให้เกิดการถอดรหัส-พันธุกรรม โดยใช้วิธีการส่งสัญญาณ (signal transduction) ยับยั้งการไหลของเลือดโดยเกล็ดเลือดและยับยั้งการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดินส์ (prostaglandins) ช่วยเสริมการทำงานของไมโทคอนเดรีย ยับยั้งการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโพโปรตีนชนิด LDL ในร่างกาย ชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เนื้องอกและทำหน้าที่ต่อต้านริ้วรอยก่อนวัย (Li et al., 2015)

2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

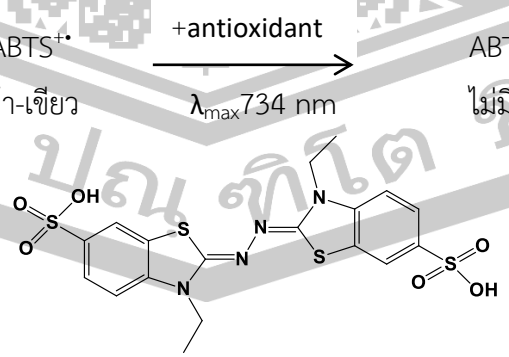
ตลอดเวลาที่ผ่านมามีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่หลากหลาย ซึ่งวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวก คือ วิธีทางสเปกโทรสโกปี เช่น DPPH assay, ABTS assay, ORAC assay และ FRAP assay (Kim, Lee, Lee, & Lee, 2002; Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006) นอกจากนี้ ยังมีวิธีอื่นที่ได้รับความนิยมอีก เช่น trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC), hydroxyl radical scavenging activity (HRSA), superoxide radical scavenging activity (SRSA) และ cupric reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC)

โดยรายละเอียดมี ดังนี้

2.5.1 วิธีดักจับอนุมูลอิสระ ABTS

วิธีดักจับอนุมูลอิสระ ABTS นี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วย โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียว มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ 660, 734 และ 820 นาโนเมตร แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร (Re et al., 1999) และสามารถนำไปคำนวณเป็นร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) ได้ ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

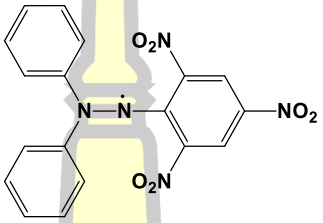
ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่ายและอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้ อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำและละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้ คือ ABTS ไม่ใช่สารตามธรรมชาติ กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาและโครงสร้างเคมีของ ABTS

2.5.2 วิธีดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

อนุมูล DPPH$^{\bullet}$ (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) (รูปที่ 2.8) เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอิสระอยู่แล้ว โดยไม่ต้องผ่านการเตรียมให้เป็นอนุมูลอิสระ เหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS$^{+\bullet}$ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Hou et al., 2001)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างเคมีของอนุมูล DPPH

อนุมูลอิสระ DPPH ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ (scavenging activity) ของสารสกัดมีสีม่วงในเมทานอลและเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ตามสมการดังนี้

DPPH$^{\bullet}$ + RH ⟶ DPPH-H + R$^{\bullet}$

สีม่วง ตัวอย่างทดสอบ สีเหลือง

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันออกมาเป็นค่าร้อยละการยับยั้ง

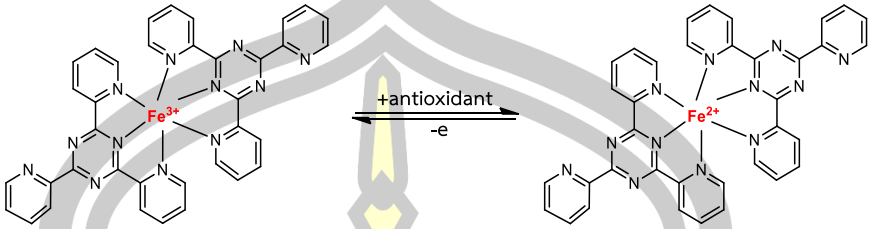
ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ อนุมูล DPPH$^{\bullet}$ มีความคงตัวไม่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้น วิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะหรือจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

2.5.3 วิธีรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (ferric ion reducing antioxidant power; FRAP) ของสารต้านอนุมูลอิสระ อาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้าน

อนุมูลอิสระให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ FRAP

ซึ่งสารในรูป $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ที่ประกอบด้วยการนำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย อะซิเตตบัฟเฟอร์และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐาน เฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ราคาถูก และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะของร่างกายและสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water) (Pulido Raquel, Bravo Laura, 2000)

2.6 อ้อย

อ้อย (sugarcane) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Saccharum officinarum* L. เป็นพืชที่ปลูกแพร่หลายทั่วโลกและถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งของโลก (Del Río et al., 2015) อ้อยใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมน้ำตาล เนื่องจากให้น้ำตาลคุณภาพดี ปลูกและบำรุงรักษาได้ง่าย ในแต่ละปี ทั่วโลกจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำตาล ประมาณ 57 ล้านตันต่อปีและเหลือกากน้ำตาลประมาณ 6.4 ล้านตัน (Amezcua-Allieri et al., 2019) นอกจากนี้ อ้อยยังใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (Zheng et al., 2017) การศึกษาสารพฤกษเคมีในอ้อยมีการเผยแพร่ครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น (Nakasone et al., 1996) โดยนักวิจัยกลุ่มนี้ ยังได้ทำการสกัดและแยกชนิดของสารพฤกษเคมีที่พบในอ้อยหลายชนิด (Takara et al., 2002) สารพฤกษเคมีที่พบในอ้อย มีฤทธิ์

ทางชีวภาพที่ดีหลายอย่าง โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (antimutation), ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซม์ไทโรซิเดส (Duarte-Almeida et al., 2007; Takara et al., 2007) มีรายงานวิจัยที่พบว่า สารสกัดจากอ้อยประกอบด้วยสารชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของไตรเทอร์พีน (triterpene) ที่เรียกว่า ไฟโตสเตอรอล (phytosterol) (Georges et al., 2006; Feng et al., 2014) สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลอเรสเตอรอล (cholesterol) และมีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมคลอเรสเตอรอลของลำไส้เล็กได้ จึงส่งผลให้ปริมาณคลอเรสเตอรอลและระดับไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein, LDL) ในกระแสเลือดต่ำด้วย

ชานอ้อย (bagasse) คือ ส่วนของลำต้นอ้อยที่ผ่านการคั้นเอาน้ำออกและเหลือเป็นเศษที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์มากนัก ในแต่ละปีมีชานอ้อยที่เหลือจากอุตสาหกรรมน้ำตาลประมาณ 280 ล้านตัน ชานอ้อยประกอบด้วยเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (Niju and Swathika, 2019; Pinheiro et al., 2017) นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก เช่น เคอร์ซิติน กรดแกลลิก กรดคูมาริก และกรดเฟอรูริกในชานอ้อย โดยสารเหล่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีและช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Zheng et al., 2017)

มีการนำชานอ้อย ไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ได้แก่

1) ใช้เป็นเชื้อเพลิง สำหรับผลิตไอน้ำและกระแสไฟฟ้าสำหรับใช้ภายในโรงงานน้ำตาล ชานอ้อยสามารถใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิง (fuel oil) ได้ดี ชานอ้อยที่มีความชื้นร้อยละ 50 หนัก 3 ตัน เมื่อเผาจะให้พลังงานไล่เลี่ยกับน้ำมันเชื้อเพลิงหนัก 1 ตัน

2) ใช้ผลิตวัสดุก่อสร้างโดยอาศัยกาว เช่น อัดเป็นแผ่น (particle board) ไม้อัดผิวเส้นใย (fiber-overlaid plywood) และแผ่นกันความร้อน (insulating board) เป็นต้น

3) ใช้ผลิตเยื่อกระดาษ (pulp) และกระดาษชนิดต่าง ๆ ชานอ้อยส่วนใหญ่ประกอบด้วยลิกนิน (lignin) และมีเซลลูโลสอยู่บ้างเล็กน้อย

4) ใช้เป็นอาหารสัตว์ ถ้าให้สัตว์กินชานอ้อยโดยตรงมักจะเกิดปัญหาเกี่ยวกับรสชาติ การย่อยของสัตว์ ตลอดจนมีอัตราส่วนระหว่างอาหารที่สัตว์กินกับน้ำหนักตัวที่เพิ่มค่อนข้างต่ำ วิธีที่ดี คือ นำมาหมักก่อนที่จะให้สัตว์กิน วัสดุที่หมักประกอบด้วยชานอ้อย 1 ตัน (ความชื้นร้อยละ 55) โซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 5 ของน้ำหนักแห้ง กากน้ำตาลร้อยละ 15 ยูเรียร้อยละ 0.8 และข้าวโพดร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ผสมแล้วทำให้มีความชื้นประมาณร้อยละ 60 หมักไว้ 4-6 สัปดาห์ จึงให้สัตว์กิน

5) ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผลิต furfural, furfuryl alcohol และ xylitol

6) ใช้ทำปุ๋ยหมัก โดยหมักร่วมกับปุ๋ยคอก กากตะกอน หรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ยังใช้ปูคอกสัตว์ เพื่อรองรับมูลสัตว์และทำปุ๋ยหมักต่อไป

7) ใช้เป็นวัตถุคลุมดิน เพื่อรักษาความชื้นของดินและป้องกันวัชพืช

2.7 การศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในอ้อย

อ้อยมีสารพฤกษเคมีสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย โดยพบว่าสารในอ้อย มีบทบาทที่สำคัญแตกต่างกัน เช่น ฟีนอลิก (phenolic) ฟลาโวนอยด์ (flavonoide) และไฟโตสเตอรอล (phytosterols) มีบทบาทสำคัญในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านการกลายพันธุ์ (antimulation) และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินและที่น่าสนใจมากกว่านี้ คือ จะพบสารในกลุ่มไฟโตสเตอรอล ได้แก่ ไตรเทอร์พีนอยด์, (triterpenoids), สติกแมสเทอรอล (stigmasterol), เบตาไซโตสเตอรอล (β-sitosterol) และสเตอรอยด์ (steroids) ที่มีส่วนช่วยลดระดับคอลเรสเตอรอล (cholesterol) และลดระดับไขมันความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein; LDL) ในเลือดด้วย

Feng et al. (2014) ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันและสารพฤกษเคมี เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีนอยด์และไฟโตสเตอรอล จาก 4 ส่วนของอ้อย 2 สายพันธุ์ในประเทศจีน ได้แก่ บริเวณแก่น ข้อต่อระหว่างปล้อง เปลือกและปลายยอด พบว่า ปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์รวม ฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และสเตอรอลรวม มีปริมาณแตกต่างกันตามบริเวณที่ตรวจสอบและสายพันธุ์อ้อย นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารพฤกษเคมี มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้าน-ออกซิเดชัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP

Bhore et al. (2012) การสกัดดอกอ้อยด้วย ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม ไดคลอโร-มีเทน เอทิลอะซิเตต บิวทานอล เมทานอลและน้ำ แล้วตรวจวัดสารพฤกษเคมี พบว่า สารสกัดดอกอ้อยประกอบด้วย แอลคาลอยด์ แทนนินส์ แอนทราควิโนน น้ำตาลรีดิวซ์ ซาโปนินส์ ฟลาโวนอยด์ พอลิฟีนอล สเตอรอยด์และเทอร์พีนอยด์ สารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ที่ก่อให้เกิดโรคเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจและลดริ้วรอย

วลัยพรรณ กระพันธ์เขียวและประสงค์ สีหานาม (2559) ตรวจสอบสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีนอยด์และสเตอรอล จากส่วนที่แตกต่างกันของอ้อย 3 สายพันธุ์ที่ปลูกในจังหวัดบุรีรัมย์ พบว่า สารที่ตรวจสอบมีปริมาณแตกต่างกันตามส่วนและสายพันธุ์ของอ้อย ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม พบปริมาณสูงสุดที่บริเวณยอดของอ้อยสายพันธุ์ K-92 ในขณะที่ปริมาณของไตรเทอร์พีนอยด์รวมและสเตอรอลรวม พบปริมาณสูงสุดในเปลือกของอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 นอกจากนี้ ปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวม มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีการดักจับอนุมูล DPPH และ ABTS รวมทั้ง

การรีดิวซ์โลหะเหล็ก (FRAP) อีกด้วย จึงกล่าวได้ว่า ทั้งพื้นที่เพาะปลูก ส่วนที่แตกต่างกันและสายพันธุ์ของอ้อยส่งผลต่อปริมาณสารพฤกษเคมี

ดวงกมล เนาวะเศษและประสงค์ สีหานาม (2560) ตรวจสอบสารพฤกษเคมีบางชนิดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสารสกัดจากเปลือกอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น-3 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์บางส่วนด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ทำการชะสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว แตกต่างกัน คือ เอทิลอะซิเตท (100 %v/v), เอทานอล (100 %v/v) และสารผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตและเอทานอลอัตราส่วน 75:25 50:50 และ 25:75 ได้ทั้งหมด 5 ส่วนชะ ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมี พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบมากที่สุดในส่วนชะที่ 2 (112.63 ± 0.01 mg GAE/100 g DW, 149.00 ± 0.50 mg QE/ 100 g DW ตามลำดับ) ในขณะที่ปริมาณไตรเทอร์-พีนอยด์รวมและปริมาณสเตอรอลรวม พบมากที่สุดในส่วนชะที่ 1 (7.72 ± 0.65 mg UA/ 100 g DW และ 200.30 ± 0.61 mg ChE/100 g DW ตามลำดับ) นอกจากนี้ ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP

Bian et al. (2015) ได้นำชานอ้อยมาแยกเฮมิเซลลูโลสด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกซ์ จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถผลิตไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (XOS) ได้สูงสุดร้อยละ 31.8 โดยมี xylobiose, xylotriose และ xylotetraose เป็นองค์ประกอบหลัก และมี oligosaccharides เช่น xylopenta-ose และ xylohexose บ้างเล็กน้อย เมื่อตรวจสอบด้วย FT-IR และ NMR พบว่า มีโครงสร้างแบบกิ่งผลึกและเมื่อใช้วิธี DPPH assay ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า XOS ที่สกัดได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงซึ่งอาจนำไปใช้ในงานที่เกี่ยวกับอาหารได้

Zheng et al. (2017) พบว่า สารสกัดชานอ้อยด้วยเอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase อีกด้วย ผลการประเมินความสามารถในการต่อต้านความดันโลหิตสูงของสารสกัด พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ sucrase และ maltase ได้ในระดับสูง และสามารถดูดซึมกลูโคสได้ดีเมื่อทดสอบด้วยเซลล์ HepG2 เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลในสารสกัดด้วย UHPLC-HR-TOFMS พบสาร 5 ชนิด ในปริมาณสูง คือ tricin 4-O-guaiacylglyceryl ether-7-O-glucopyranoside, genistin, p-coumaric acid, quercetin และ genistein ข้อมูลจากการวิจัยนี้บ่งชี้ว่า ชานอ้อยอ้อยสามารถใช้เป็นแหล่งสารประกอบฟีนอลที่มีศักยภาพทางชีวภาพ และการเพิ่มรายได้อุตสาหกรรมเกษตร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในบทนี้จะกล่าวถึงหัวข้อที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

3.1 ชานอ้อยตัวอย่าง

3.2 สารเคมี

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.4 วิธีการทดลอง

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.1 ชานอ้อยตัวอย่าง

ชานอ้อย ที่ใช้ทำการทดลองครั้งนี้ คือ พันธุ์ Khon Kaen 1 และ Khon Kaen 2 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลในจังหวัดบุรีรัมย์ โดยอ้อยมีอายุประมาณ 13 เดือน และปลูกโดยเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์ อ้อยที่ส่งโรงงานจะนำไปหีบเอาน้ำเพื่อใช้ผลิตน้ำตาล ส่วนที่เหลือ คือ ชานอ้อย การเตรียมชานอ้อยแต่ละลายพันธุ์ ทำโดยขอความอนุเคราะห์จากพนักงานของโรงงานที่หีบเอาน้ำด้วยวิธีการหีบด้วยเครื่องขนาดเล็ก

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีสำหรับการทดลอง

สารเคมี	สูตรเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต
2,2’-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic acid) (ABTS)	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	AR	Sigma-Aldrich
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	AR	Sigma-Aldrich
2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	$C_{18}H_{12}N_6$	AR	Sigma-Aldrich
Acetic acid	CH_3COOH	AR	Merck
Cholesterol	$C_{27}H_{46}O$	AR	Sigma-Aldrich
Ethanol	C_2H_5OH	AR	Merck
Ferric chloride hexahydrate	$FeCl_3.6H_2O$	AR	Carlo Erba

ตารางที่ 3.1 สารเคมีสำหรับการทดลอง (ต่อ)

สารเคมี	สูตรเคมี	เกรด	บริษัทผู้ผลิต
Folin-Ciocalteu's Reagent	-	AR	Carlo Erba
Gallic acid	$C_7H_6O_5$	AR	Sigma-Aldrich
Hydrochloric acid	HCl	AR	Merck
Perchloric acid	$HClO_4$	AR	Merck
Potassium persulfate	$K_2S_2O_8$	AR	Merck
Sodium acetate	CH_3COONa	AR	Merck
Sodium carbonate	Na_2CO_3	AR	Merck
Sodium hydroxide	NaOH	AR	Merck
Sodium nitrite	$NaNO_2$	AR	Merck
Sulfuric acid	H_2SO_4	AR	Merck
Ursolic acid	$C_{30}H_{48}O_3$	AR	Sigma-Aldrich
Vanillin	$C_8H_8O_3$	AR	Sigma-Aldrich

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือสำหรับการทดลอง

เครื่องมือ	รุ่น
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorius BSA 224S-CW
เครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	UV-1800 SHIMADZU
เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน	Buchi Rotavapor R-210
ตู้อบความร้อน)	Memmert SNB 100
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert WNB

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างชานอ้อยที่ได้จากโรงงานน้ำตาลมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้เป็นผง ร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 60-mesh เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องในภาชนะปิดสนิท นำผงชานอ้อยที่เตรียมไว้มาสกัดโดยการหมักด้วยเอทานอล ในอัตราส่วนผงอ้อย 1 กรัมต่อเอทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ในทุกตัวอย่าง นำสารสกัดหยาบที่ได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายสารสกัดหยาบโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล 20 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ทันทีหลังจากเตรียมเป็นสารละลาย

3.4.2 การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี

3.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content; TPC) ในสารสกัด-หยาบทำการตรวจวัดด้วยการทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocateu reagent โดยดัดแปลงวิธีของ Cappellari et al. (2013) และใช้กรดแกลลิก เป็นสารมาตรฐาน ขั้นตอนในการวิเคราะห์โดยย่อมีดังนี้ นำสารสกัดหยาบมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 10% w/v Folin-Ciocalteu reagent (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม 7.5% w/v โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นเขย่าและนำสารผสมตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สุดท้ายนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย ปริมาณ ฟีนอลลิกรวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก และแสดงค่าเป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิกเทียบเท่าต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบแห้ง (mg GAE/100 g DW)

3.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content; TFC) ในสารสกัดหยาบทำการตรวจวัดโดยดัดแปลงวิธีของ Piechowiak et al. (2020) และใช้ควอซิติน เป็นสารมาตรฐาน ขั้นตอนในการวิเคราะห์โดยย่อมีดังนี้ นำสารสกัดหยาบมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออน 0.4 มิลลิลิตร และสารละลาย 5% w/v โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที เติม 10% w/v อะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) 0.6 มิลลิลิตร ตั้งไว้อีก 6 นาที แล้วเติม 4% w/v โซเดียมไฮดรอก-ไซด์ (NaOH) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารผสมทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะนำสารละลายผสมไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการ

ทดลองซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของควอซิตินเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ค่าที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินเทียบเท่าต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบแห้ง (mg QE/100 g DW)

3.4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์รวม

ปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์รวม (total triterpenoid content; TTC) ในสารสกัด-หยาบ ทำการตรวจวัดโดยดัดแปลงวิธีของ Ni et al. (2012) และใช้กรดยูร์โซลิก (ursolic acid) เป็นสารมาตรฐาน ขั้นตอนในการวิเคราะห์โดยย่อมีดังนี้ นำสารสกัดหยาบมา 0.3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไประเหยให้แห้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมสารละลาย vanillin-acetic acid (5:95 w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง นำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นย้ายหลอดทดลองไปใส่อ่างน้ำเย็น (Ice water bath) แล้วเติม กรดอะซิติก (CH_3COOH) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 548 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดยูร์โซลิกเพื่อหาปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์รวม ค่าที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดยูร์โซลิกเทียบเท่าต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบแห้ง (mg URE/100 g DW)

3.4.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสเตอรอลรวม

ปริมาณสเตอรอลรวม (total sterol content; TSC) ในสารสกัดหยาบ ตรวจวัดตามวิธี Liebermann-Burchard (LB) colorimetric โดยดัดแปลงวิธีของ Valitova et al. (2019) และใช้คอเรสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารมาตรฐาน ขั้นตอนในการวิเคราะห์โดยย่อ มีดังนี้ เตรียม LB color reagent โดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ acethyl chloride ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้น เติมสารละลายไขมันสารสกัดจากชานอ้อยในคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการปั่นกวนเป็นเวลา 1 นาที ด้วยเครื่องปั่นกวน (magnetic stirrer) เก็บสารละลายผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 13 นาที สุดท้ายทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของคอเรสเตอรอลเพื่อหาปริมาณสเตอรอลรวม ค่าที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของคลอเรสเตอรอลเทียบเท่าต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบแห้ง (mg ChE/100 g DW)

3.4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชานอ้อย

3.4.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH

ฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอ้อยตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยากับ 2,2-diphenyl-1-picrythydrazyl (DPPH) โดยดัดแปลงวิธีของ Thaipong et al. (2006) ขั้นตอนในการตรวจสอบทำได้โดยนำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.1 mM DPPH ในเมธานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง สุดท้ายนำไปคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง จากสมการ

ร้อยละการยับยั้ง = $[(A_{517}$ of control $- A_{517}$ of sample$)/ A_{517}$ of control$] \times 100$

จากนั้น นำค่าร้อยละการยับยั้งไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethychlorman-2-carboxylic acid) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของโทรล็อกซ์เทียบเท่าต่อกรัมสารสกัดหยาบแห้ง (mg TE/g DW)

3.4.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ดักจับอนุมูล ABTS

ฤทธิ์การดักจับอนุมูล ABTS ของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยดัดแปลงวิธีของ (Van Den Berg, Haenen, Van Den Berg, & Bast, 1999) ขั้นตอนในการวิเคราะห์โดยย่อ มีดังนี้ เตรียมอนุมูลอิสระ $ABTS^{+\bullet}$ โดยการผสมระหว่าง 7 mM ABTS และ 2.45 mM โปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางสารละลายผสมให้มีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำสารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ เจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปคำนวณร้อยละการยับยั้ง ดังสมการ

ร้อยละการยับยั้ง = $[(A_{734}$ of control $- A_{734}$ of sample$)/ A_{734}$ of control$] \times 100$

จากนั้น นำค่าร้อยละการยับยั้งไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของโทรล็อกซ์เทียบเท่าต่อกรัมสารสกัดหยาบแห้ง (mg TE/g DW)

3.4.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์การรีดิวซ์เหล็กไอออน

ฤทธิ์การรีดิวซ์เหล็กไอออนของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยดัดแปลงวิธีของ (Zhang et al., 2010) ขั้นตอนในการวิเคราะห์โดยย่อ มีดังนี้ นำสารสกัดหยาบ 0.06 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ที่ประกอบด้วยสารละลาย 10 mM 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 300 mM acetate buffer pH 3.6, 20 mM ferric chloride ใน 40 mM HCl (อัตราส่วน 1:10:1) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมกับน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 0.18 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ฤทธิ์การรีดิวซ์เหล็กไอออนของสารสกัดแสดงด้วยค่ามิลลิโมลาร์ของไอรอน (II) ซัลเฟตเทียบเท่าต่อกรัมสารสกัดหยาบแห้ง (mM $FeSO_4$/ g DW)

3.4.4 การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3.4.4.1 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

ทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (ฤทธิ์ต้านเบาหวาน) โดยดัดแปลงวิธี Obaroakpo et al. (2019) ทำได้โดยการผสมเอนไซม์กลูโคซิเดส (0.1 mL)) กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.4 mL, 0.1M, pH 6.9) จากนั้นเติมสารสกัดปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน นำสารละลายผสมที่ได้บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วเติมสับสเตรตของเอนไซม์กลูโคซิเดส คือ PNPG ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปในสารผสม ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาที ก่อนหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.2M $NaCO_3$ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิเดสของสารสกัดคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งและแสดงด้วยค่า IC_{50}

$$\% \text{ Inhibition} = [(Ac-As) / As] \times 100$$

โดยที่ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม ส่วน As = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.4.4.2 การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยดัดแปลงวิธี Chen et al. (2016) ทำได้โดยการผสมเอนไซม์ไทโรซิเนส (0.5 mL) หรือสับสเตรต คือ DOPA (2 mM) กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.4 mL, 25 mM, pH 6.8) จากนั้นเติมสารสกัดปริมาตร

0.05 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (1-40 mg/mL) นำสารละลายผสมที่ได้บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีแล้วเติมเอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรลงไปในสารผสม ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่อ 475 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งและแสดงด้วยค่า IC_{50}

$$\% \text{ Inhibition} = [(Ac-As) / As] \times 100$$

โดยที่ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม ส่วน As = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีแต่ละชนิด

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากชานอ้อยด้วยเครื่อง RP-HPLC (Shimadzu LC-20AC pumps (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), SPD-M20A โดยใช้diode array เป็นตัวตรวจวัด และคอลัมน์ Inetsil ODS-3, C18 (4.6 mm x 250 mm, i.d. 5 μm) สภาวะการชะคอลัมน์ดัดแปลงตามวิธีของ เฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมที่ประกอบด้วย 1.2% acetic acid ในน้ำปราศจากไอออน (pH 2.7) (solvent A) และ acetonitrile (solvent B) ปรับอัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการชะด้วยระบบเกรเดียนท์ (gradient elution) ปรับอุณหภูมิคอลัมน์เป็น 38 องศาเซลเซียส และฉีดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วง 200-600 นาโนเมตร ทำการแยกสารประกอบในสารสกัดโดยเปรียบเทียบเวลาที่ปรากฏสเปกตรัมกับสารมาตรฐานแต่ละชนิด (external standard method) และคำนวนหาปริมาณจากการเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ความแตกต่างของปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากนั้นเปรียบเทียบหาค่า ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยเปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธี Tukey Post-Hot test และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย การหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficient, *r*)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ในบทนี้จะกล่าวถึงหัวข้อที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี

4.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.3 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

4.4 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

4.5 ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากชานอ้อยเมื่อตรวจสอบด้วย HPLC

4.1 การตรวจวัดปริมาณสารพฤกษเคมี

เป็นที่ทราบดีว่า อ้อยที่ปลูกส่วนใหญ่แล้วจะถูกนำส่งโรงงานน้ำตาลเพื่อนำไปผลิตน้ำตาลมากกว่า 70% ทั้งที่จริง ๆ แล้วอ้อยถูกนำไปใช้ในการส่งเสริมสุขภาพมาตั้งแต่อดีตเช่นกัน เช่น ราก และลำต้นของอ้อยเอาไปใช้ในการรักษาผิวหนังและโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ รักษาข้อต่อ บำรุงหัวใจ ช่วยเร่งน้ำนม รักษาอาการไอ บำรุงเลือด (Abbas et al., 2014) รวมทั้งอาการตัวเหลือง และความดันโลหิตต่ำ (Mira et al., 2011) และในแต่ละปีจะเหลือชานอ้อยหรือส่วนที่ผ่านการคั้นน้ำออกแล้วมากกว่า 0.28 x 109 ตัน (Pinheiro et al., 2017) โดยส่วนใหญ่แล้วชานอ้อยจะนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในโรงงานผลิตน้ำตาล (Sun et al., 2004) ใช้ผลิตกระแสไฟฟ้า เยื่อกระดาษและปุ๋ยหมัก (Pandey et al., 2000) ส่วนผสมในสารเคมี พลาสติก สี วัสดุสังเคราะห์ สารชะล้าง (Aslam and Khan, 2001) อย่างไรก็ตาม หากสามารถนำชานอ้อยมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดสารเพื่อส่งเสริมสุขภาพ คงจะเป็นเรื่องที่น่าสนใจไม่น้อย (Zheng et al., 2017) มีรายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีในอ้อย พบว่า อ้อยอุดมด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น ฟีนอลิก ไตรเทอร์พีนอยด์ ไฟโตสเตอรอล (Feng et al., 2014) และลิกนินส์ (Pinheiro et al., 2017) รวมทั้งวิตามินและเกลือแร่บางชนิด (Duarte-Almeida et al., 2011)

ปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากชานอ้อย แสดงดังตารางที่ 4.1 โดย พบว่า ชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีปริมาณฟีนอลิกรวม (35.19 mg GAE/g DW) ฟลาโวนอยด์รวม (101.47 mg QE/g DW) ไตรเทอร์พีนอยด์รวม (7.73 mg UrE/g DW) สูงกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 1 เมื่อเทียบสารชนิดเดียวกันประมาณ 1.13, 1.4 และ 1.8 เท่า ตามลำดับ ทั้งที่ร้อยละการได้กลับ (% yield) สารสกัดหยาบของชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีค่าต่ำกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 1 ประมาณ 1.27 เท่า แต่ปริมาณสเตอรอลรวม (58.27 mg ChE/g DW) ในสายพันธุ์ขอนแก่น 2 ต่ำกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 1 ประมาณ 0.8 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารพฤกษเคมีทั้ง 3 ชนิดที่ทำการตรวจสอบ พบว่า ชานอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์จะตรวจพบฟลาโวนอยด์ (TFC) ในปริมาณที่สูงกว่าสารอื่น ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้คล้ายกับการศึกษาของ Feng et al. (2014) ที่พบฟลาโวนอยด์มากที่สุดที่เปลือกอ้อยที่มีสีแดง Colombo et al. (2006) ที่ได้ทำการตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ในส่วนต่าง ๆ ของอ้อยในประเทศบราซิลและได้กล่าวว่าฟลาโวนอยด์ที่พบในอ้อยเป็นสารที่มีประโยชน์เชิงโภชนาการและมีปริมาณสูงในอ้อยเมื่อเทียบกับที่พบในอาหารหรือพืชอื่น โดยปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในใบและชานอ้อย มีค่าประมาณ 1.70 และ 0.38 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด ซึ่งจะเห็นว่าชานอ้อยสายพันธุ์ไทยทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าประมาณ 2 และ 2.6 เท่า ในสายพันธุ์ขอนแก่น 1 และ ขอนแก่น 2 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณฟลาโวนอยด์ในพืชชนิดอื่นที่เคยมีรายงานไว้ จะมีค่าแตกต่างกัน ดังนี้ ในแอปเปิ้ล พบในช่วง 0.98-1.43 มิลลิกรัม (Eberhardt, Lee, Liu, 2000) หัวหอม 0.71-0.80 มิลลิกรัม (Rhodes and Price, 1996) มะเขือเทศ 0.05-0.30 มิลลิกรัม (Willcox, Catignani, Lazarus, 2003) และน้ำผึ้ง 0.30 มิลลิกรัม (Yao et al., 2003) ต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตาม ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าต่ำกว่าที่พบในเปลือก แก่นของอ้อยสายพันธุ์ Badila และเปลือก แก่น ยอด และข้อต่อของอ้อยสายพันธุ์ Yuetang 54-474 ในประเทศจีน แต่มีปริมาณสูงกว่าฟลาโวนอยด์ที่พบที่ยอดและข้อต่อของอ้อยสายพันธุ์ Badila (Feng et al., 2014)

ปริมาณฟีนอลิกรวมในชานอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ที่ทำการตรวจสอบมีค่าใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 30-35 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่มีรายงานการตรวจสอบฟีนอลิกในอ้อยสายพันธุ์ Badila และ Yuetang 54-474 ในประเทศจีน ที่พบปริมาณฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 260-866 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม แตกต่างกันไปตามบริเวณที่นำมาศึกษา (Feng et al., 2014) มีรายงานการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดจากชานอ้อยโดยใช้การสกัดแบบลำดับส่วนแล้วทำการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า มีปริมาณตั้งแต่ 70-200 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยผู้วิจัยได้รายงานว่าขั้นตอนในการสกัดมีความสำคัญมากต่อปริมาณสารที่จะสกัดได้และการใช้เครื่อง ultrasonic ถือว่ามีประโยชน์ในการสกัดมาก เนื่องจากเปลือกอ้อยประกอบด้วยเซลลูโลสที่มีความแข็งแรงมากและป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายพาสารที่ต้องการสกัดออกมา (Xu et al., 2005) โดยสารประกอบฟีนอลิกพบปริมาณสูงที่บริเวณเปลือกเป็นหลัก (Zhang et al., 2010) และมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อทำการแยกส่วนและทำบริสุทธิ์สารสกัด (Zheng et al., 2017) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น เช่น เปลือกมันฝรั่ง (291 มิลลิกรัม) (Mohdaly et al., 2013) และเปลือกหอม (250 มิลลิกรัม) ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (Kahkonen et al., 1999) พบว่า ในชานอ้อยที่ทำการศึกษานี้มีปริมาณ ต่ำกว่า

ปริมาณไตรเทอพีนอยด์รวมและสเตอรอลรวมในชานอ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Feng et al. (2014) ซึ่งจะมีค่ามากกว่าถึง 10-20 เท่า โดยบริเวณที่มีไตรเทอร์พีนอยด์สูงที่สุดจะพบที่ข้อต่อของอ้อย ซึ่งความแตกต่างน่าจะมาจากวัตถุดิบที่นำมาสกัด เพราะในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกส่วนที่ไม่มีข้อต่อมาสกัดจึงตรวจพบสารดังกล่าวในปริมาณต่ำ สารสองตัวเป็นกลุ่มไฟโตสเตอรอลที่มีความสำคัญในเชิงคุณภาพ (Plat and Mensink, 2001; Lagarda, Garcia-Llatas, Farre, 2006) ผลการศึกษาที่ได้นี้ยืนยันว่าชานอ้อยเป็นแหล่งของไฟโตสเตอรอลที่น่าสนใจ

ตารางที่ 4.2ปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากชานอ้อย

Extracts	Extraction Yield (%)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	TTC (mg UrE/g)	TSC (mg ChE/g)
Khon Kaen 1	2.256 ± 0.08	30.75 ± 0.38	73.07 ± 2.05	4.34 ± 0.34	72.21 ± 4.30
Khon Kaen 2	1.783 ± 0.02	35.19 ± 1.04	101.47 ± 3.89	7.73 ± 0.57	58.27 ± 0.91

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

4.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

รายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า อ้อยเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (Feng et al., 2014; Duarte-Almeida et al., 2011; Nakasone et al., 1996; Takara et al., 2002) รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์และฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์บางชนิด (Duarte-Almeida et al., 2007; Takara et al., 2007) และการลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกาย (Plat and Mensink, 2001)

ตารางที่ 4.2 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชานอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่ง DPPH เป็นอนุมูลอิสระของไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปของอนุมูลอิสระอยู่แล้วไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระอีก เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระให้หรือรับอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ DPPH จะได้เป็น diphenyl picrylhydrazyl (DPPH:H) สีที่เกิดขึ้นจะมีสีเหลืองนวล (Naik et al., 2003) สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 520 nm (Molyneux, 2004) โดยค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันโดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Thaipong et al., 2006) และมักแสดงผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยค่าการยับยั้งอนุมูลที่ 50% (IC_{50}) (Kedare and Singh, 2011) จากตาราง พบว่า สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ ขอนแก่น 2 มีฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 1 เล็กน้อย มีค่า IC_{50} ปานกลางที่ประมาณ 930 และ 970 µg/mL ซึ่งต่ำกว่า Trolox และ ascorbic acid ประมาณ 80 และ 135 เท่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่า ผลการทดสอบในครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงและต่ำกว่าเพียงเล็กน้อยประมาณ 3-5 เท่า (Feng et al., 2014)

เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดักจับอนุมูล ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะมีสีจางลง เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของอะตอมไฮโดรเจน (Marc et al., 2004) จากตาราง 4.2 พบว่า สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ ขอนแก่น 2 มีฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 1 เล็กน้อย มีค่า IC_{50} ปานกลางที่ประมาณ 110 และ 147 µg/mL ซึ่งต่ำกว่า Trolox และ ascorbic acid ประมาณ 9-12 และ 15-20 เท่า ตามลำดับ จากผลการทดลอง จะเห็นว่าสารพฤกษเคมีในชานอ้อยทั้งสองสายพันธุ์สามารถดักจับอนุมูลประจุบวกที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นกลางอย่าง DPPH หรือกล่าวอีกอย่างคือ สารพฤกษเคมีที่ประกอบในชานอ้อยจะเข้าไปสร้างพันธะกับประจุบวกได้ดีกว่าการให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์กับรายงานการวิจัยของ Ali et al. (2019) ซึ่งทำการสกัดสารจากอ้อยและกากน้ำตาลและตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า มีค่า 9.6 และ 11.8 mg TE/g DW ซึ่งค่าที่ได้นี้ต่ำกว่าที่ตรวจ

พบในการทดลองครั้งนี้ถึง 10-14 เท่า แสดงให้เห็นว่า อ้อยที่ปลูกในประเทศไทย อุดมด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะไอรอน (Fe) เป็นอีกกลไกหนึ่งในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารพฤกษเคมี เป็นการทดสอบความสามารถของสารพฤกษเคมีในการให้อิเล็กตรอน (รีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+}) (Feng et al., 2014) โดย Fe^{2+} ที่เกิดจะไปก่อตัวเป็นโครงสร้างซับซ้อนของ ferric ion-TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine) เกิดเป็นสีน้ำเงินเข้ม (Pulido et al., 2000) ผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ ขอนแก่น 2 มีฤทธิ์ในการรีดิวซ์โลหะ (26.59 mM $FeSO_4$/g DW) สูง กว่าสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 1 เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในสารสกัดมีสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มของ dihydroxyl polyphenols อยู่มาก เช่น gentisic acid, salicylic acid, naringenin, apigenin, tricin and luteonin (Coutinho et al., 2016;) ซึ่งสารในกลุ่มนี้มีความสามารถในการเกิดโคออร์ดิเนชันกับ Fe^{2+} ได้ดีส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการจับกับโลหะสูง (Antoniolli et al., 2015; Visioli et al., 2011) และค่าที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สูงกว่าที่เคยรายงานการวิจัยของ Ali et al. (2019) ซึ่งทำการสกัดสารจากอ้อยและกากน้ำตาลและตรวจสอบฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอน พบว่า มีค่า 13.46 และ 18.4 mg TE/g DW ตามลำดับ นอกจากนี้ ทั้งไตรเทอร์-พีนอยด์และสเตอรอลรวมที่พบในปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ สารทั้งสองมีส่วนช่วยในการลดอนุมูลอิสระและลดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่มี Fe^{2+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ (Feng et al., 2014)

อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างโดยเฉพาะเอกลักษณ์ของสารพฤกษเคมีที่จำเพาะต่ออนุมูลอิสระแต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น วิธี ABTS จะจำเพาะกับสารต้านอนุมูลที่มีขั้วสูง (Del Caro et al., 2004) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยสำคัญอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสารพฤกษเคมีที่แตกต่างในอ้อย เช่น สายพันธุ์ของอ้อย สภาพอากาศ ชนิดของดิน วิธีการดูแล รูปแบบการสกัด วิธีการตรวจวิเคราะห์ หรือวิธีการแยกสารพฤกษเคมีเหล่านั้น (Asikin et al., 2016; Segul et al., 2015; Guerra and Mujica, 2010; Kadam et al., 2008)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชานอ้อย

Extracts	DPPH• assay		ABTS•+ Assay		FRAP assay (μmol Fe^{2+}/g)
	IC_{50} (μg/mL)	(mg TE/g)	IC_{50} (μg/mL)	(mg TE/g)	
Khon Kaen 1	971.02 ± 13.44	13.87 ± 0.99	147.15 ± 7.23	110.07 ± 2.97	22.69 ± 2.22
Khon Kaen 2	938.36 ± 67.84	17.32 ± 0.92	110.30 ± 2.35	150.85 ± 5.50	26.59 ± 1.56
Trolox	12.12 ± 0.19		12.78 ± 0.25		-
Ascorbic acid	7.89 ± 0.10		8.91 ± 0.42		-

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

4.3 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากอ้อยแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ซึ่งโดยทั่วไปค่า r จะมีค่าตั้งแต่ -1 ถึง 1 ถ้าค่า r เป็นลบ (-) แสดงว่า ตัวแปรที่ศึกษามีความสัมพันธ์ตรงกันข้าม หากเข้าใกล้ 0 แสดงว่าตัวแปรมีความสัมพันธ์น้อย หรือถ้าเป็น 0 แสดงว่าตัวแปรไม่มีความสัมพันธ์กันเลย แต่ถ้าหากเป็นบวก (+) แสดงว่าตัวแปรมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน ซึ่งตารางการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแสดงดังตารางที่ 4.3 จากตารางแสดงให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์กับฟลาโวนอยด์รวมและไตรเทอร์พีนอยด์รวมสูง และค่อนข้างสัมพันธ์กับสเตอรอลรวม แสดงให้เห็นว่าทำงานร่วมกันได้ดีโดยเฉพาะฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเฉพาะเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (r = -0.957 หรือ 95.7%), ABTS (r = -0.916 หรือ 91.6%) และมีความสัมพันธ์ปานกลางกับวิธี FRAP (r = 0.622 หรือ 62.2%) ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม มีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์รวมมากกว่าสเตอรอลรวม และมีค่าสหสัมพันธ์สูงเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (r = 0.950 หรือ 95.5%), ABTS (r = 0.822 หรือ 82.2%) และมีความสัมพันธ์ปานกลางกับวิธี FRAP (r = 0.480 หรือ 48.0%) ไตรเทอร์พีนอยด์รวมมีค่าสหสัมพันธ์ที่ดีกับปริมาณสเตอรอลรวม (r = 0.784 หรือ 78.4%) และมีค่าสหสัมพันธ์สูงเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (r = 0.950 หรือ 95.5%), ABTS (r = 0.967 หรือ 96.7%) และมีความสัมพันธ์ค่อนข้างสูงกับวิธี FRAP (r = 0.721 หรือ 72.1%) ส่วนสเตอรอลรวมมีค่าสหสัมพันธ์ค่อนข้างสูงกับเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (r = 0.755 หรือ 75.5%), แต่มีค่าสหสัมพันธ์สูงกับเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS (r = 0.949 หรือ 94.9%) และวิธี FRAP (r = 0.908 หรือ 90.8%) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีที่ใช้ทดสอบพบว่า วิธี DPPH มีค่าสหสัมพันธ์กับวิธี ABTS สูงกว่าวิธี FRAP ในขณะที่วิธี ABTS มีค่าสหสัมพันธ์กับวิธี FRAP สูงกว่าวิธี DPPH

จากผลการทดลองที่ได้ จะเห็นว่าสารพฤกษเคมีทั้ง 4 ชนิด ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยสารที่มีฤทธิ์ดักจับอนุมูล DPPH ได้ดี คือ ฟีนอลิกรวม > ไตรเทอร์พีนอยด์ > ฟลาโวนอยด์รวม > สเตอรอลรวม ส่วนสารที่มีฤทธิ์ในการดักจับอนุมูล ABTS ได้ดี คือ ไตรเทอร์พีนอยด์ > สเตอรอลรวม > ฟีนอลิกรวม > ฟลาโวนอยด์รวม ในขณะที่สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP คือ สเตอรอลรวม > ไตรเทอร์พีนอยด์ > ฟีนอลิกรวม > ฟลาโวนอยด์รวม ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่เคยมีรายงานไว้ที่พบว่า สารกลุ่ม polyphenol สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ ดีเพราะมีโครงสร้างเคมีที่ประกอบด้วยหมู่ phenol ซึ่งมีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่ดี (Lopes et al., 1999) เมื่อปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากจะทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เมทอกซี่ (-$OHCH_3$)

สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ดี (Mariod et al., 2009, Butsat et al., 2009) รายงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่ พบว่า หากปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีปริมาณมากจะให้ผลการทดสอบที่มีค่าสูงเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี FRAP (Feng et al., 2014; Bakar et al., 2011) อย่างไรก็ตาม ผลการทอลองที่ได้ในครั้งนี้ พบว่า ทั้งฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีค่าสหสัมพันธ์กับวิธี FRAP แค่ปานกลางแต่จะมีค่าสูงกับไตรเทอร์พีนอยด์ ซึ่งผลที่ได้นี้ค่อนข้างแตกต่างกับรายงานการวิจัยของ Feng et al. (2014) ที่กล่าวว่า ไตรเทอร์พีนอยด์ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 4.4 สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

	TPC	TFC	TTC	TSC	DPPH$^{\bullet}$	ABTS$^{\bullet+}$	FRAP
TPC	1	.947**	.974**	.857*	-.957**	-.916*	.622
TFC	-	1	.939**	.693	-.934**	-.822*	.480
TTC	-	-	1	.874*	-.950**	-.967**	.721
TSC				1	-.755	-.949**	.908*
DPPH$^{\bullet}$	-	-	-		1	.876*	.533
ABTS$^{\bullet+}$	-	-	-		-	1	.860*
FRAP	-	-	-		-	-	1

** Correlation is significant at the 0.01 level.

* Correlation is significant at the 0.05 level.

4.4 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด โดยเฉพาะเอนไซม์ α-glucosidase ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด (hyperglycemia) (Zheng et al., 2017; Said et al., 2008) และเอนไซม์ tyrosinase ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนัง (Sari et al., 2019) ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ได้รับความสนใจมาก ทั้งนี้เป็นเพราะว่า เอนไซม์ α-glucosidase นั้นสัมพันธ์กับโรคเบาหวานที่ถือเป็นปัญหาของประชากรทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศไทย ส่วนเอนไซม์ tyrosinase ก็เป็นอีกเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายของการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแก้ปัญหาฝ้าและกระบนใบหน้า ดังนั้น หากค้นพบสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์นี้ได้จะเป็นประโยชน์ไม่น้อยและอาจนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ได้

ตารางที่ 4.4 แสดงฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมการทานของเอนไซม์ α-glucosidase พบว่าสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 (IC_{50} = 1601.81 µg/mL) มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ได้สูงกว่าสารสกัดจากชานอ้อยสารพันธุ์ขอนแก่น 1 (IC_{50} = 2033.02 µg/mL) ซึ่งค่าที่ได้นี้ต่ำกว่าสารมาตรฐาน คือ acarbose (IC_{50} = 933.86 µg/mL) ประมาณ 1.7 และ 2.2 เท่าตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อนที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase (sucrase และ maltase) ของสารสกัดจากชานอ้อยในประเทศจีน พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ sucrase และ maltase ที่ค่า IC_{50} = 6050 และ 6733 µg/mL ตามลำดับ (Zheng et al., 2017) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากชานอ้อยที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะสามารถนำไปใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ และผลการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase น่าจะสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยเฉพาะฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น luteolin, gentistic acid (Kim, Kwon, Son 2000; Custodio et al., 2015)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (EC 1.14.18.1) เป็นกลุ่มของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase enzyme) พบได้ทั่วไปในพืช เห็ดรา สัตว์และแบคทีเรีย ทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ให้กับกรดอะมิโนไทโรซีนให้กลายเป็น 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA) และรีดิวซ์ DOPA ให้กลายเป็นโดปาควิโนน (dopaquinone) โดยใช้โมเลกุลออกซิเจน (Sánchez-Ferrer et al., 1995; Decker and Tuczeck, 2000; Zhang et al., 2017) จากนั้น โดปาควิโนนจะกลายเป็นสารสีชีวภาพ เช่น เมลานิน (melanin) ซึ่งสารดังกล่าวทำหน้าที่ปกป้องผิวหนังจากแสงอัลตราไวโอเลต การผลิตเมลานินที่มากเกินไปเป็นสาเหตุของกระ ฝ้าและจุดด่างดำบนใบหน้า (Fan et al., 2017; Solano, 2014) นอกจากนี้ เอนไซม์ไทโรซิเนส

ยังเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของโรคระบบประสาท อย่างเช่น โรคพาร์กินสัน (Parkinson) (Carballo-Carbajal et al., 2019; Asanuma, Miyazaki, Ogama, 2003) หากสารใดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดโรคพาร์กินสันได้ (Xu et al., 1997) และยังมีรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า ไทโรซิเนสเป็นปัญหาหลักของการเกิดจุดน้ำตาลในผักผลไม้ ที่จะนำไปสู่การเน่าเสียเร็วขึ้นและคุณค่าทางโภชนาการลดลง (Gou et al., 2017; Pravez et al., 2007) การตรวจหาสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) ได้จึงมีความน่าสนใจมาก (Si et al., 2012; Sari et al., 2019)

ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ในสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 1 (IC_{50} = 3974.65 µg/mL) มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ขอนแก่น 2 (IC_{50} =4997.28 µg/mL) ซึ่งค่าที่ได้นี้ต่ำกว่าสารมาตรฐาน คือ kojic acid (IC_{50} = 94.34 µg/mL) ประมาณ 42 และ 53 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดจากพืช *Vinca major* L. จะมีฤทธิ์ต่ำกว่า เนื่องจากสารสกัดดังกล่าว มีฤทธิ์ต่ำกว่า kojic acid ประมาณ 2.4 เท่า (Sari et al., 2019) และในสารสกัดจากเปลือกของพืช *Quercus coccifera* มีค่า IC_{50} = 50.1 µg/mL (Sari et al., 2019) ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส สูงกว่าสารสกัดจากชานอ้อยที่ตรวจสอบในครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม แม้ฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของสารสกัดจากชานอ้อยจะต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส แต่ก็ยังทำให้ทราบว่า สารสกัดจากอ้อยมีฤทธิ์ดังกล่าวอยู่ ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากสารที่สกัดได้มีปริมาณน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการสกัดยังไม่เหมาะสม จำเป็นจะต้องหาวิธีสกัดใหม่เพื่อให้สามารถสกัดสารได้มากขึ้น และอาจต้องมีการทำบริสุทธิ์สารสกัดที่ได้เพื่อเพิ่มศักยภาพของสารต่อไป

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารสกัดจากชานอ้อย

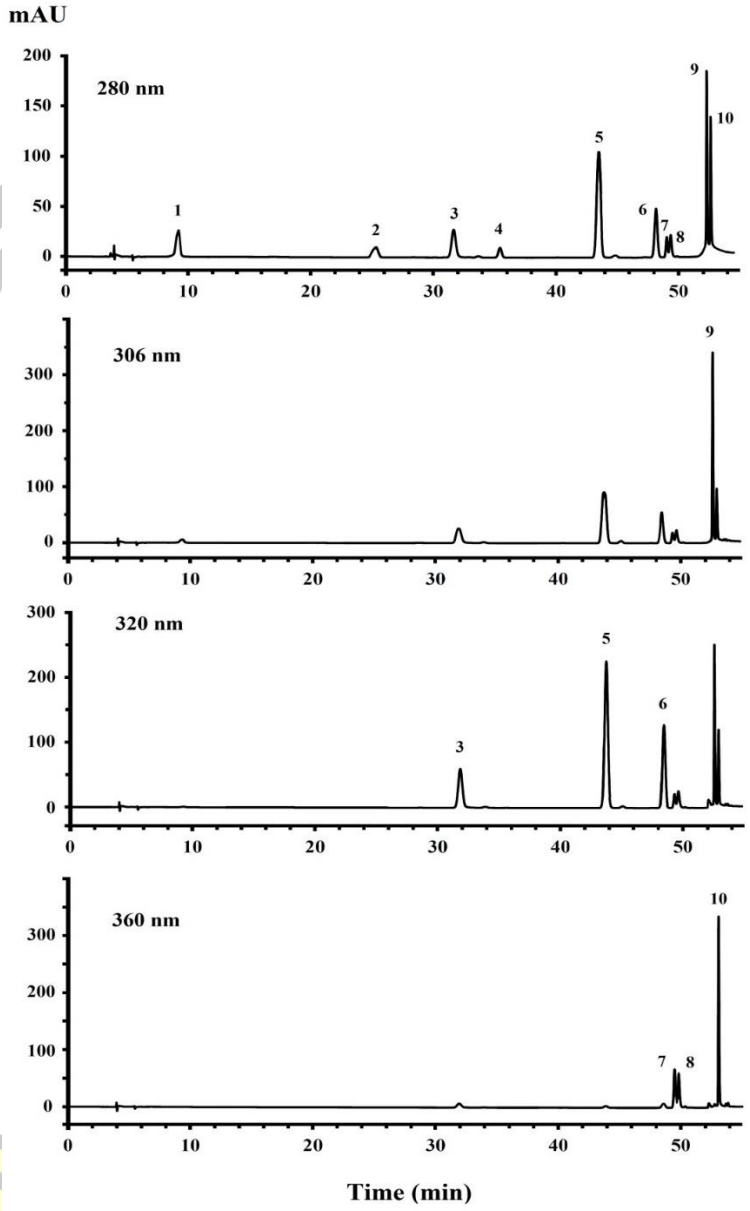
Extracts	α-glucosidase inhibition IC_{50} (mg/mL)	Tyrosinase inhibition IC_{50} (µg/mL)
Khon Kaen 1	2033.02 ± 122.51	3974.65 ± 125.86
Khon Kaen 2	1601.81 ± 93.76	4997.28 ± 71.34
Acarbose	933.86 ± 14.27	-
Kojic acid	-	94.34 ± 0.41

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

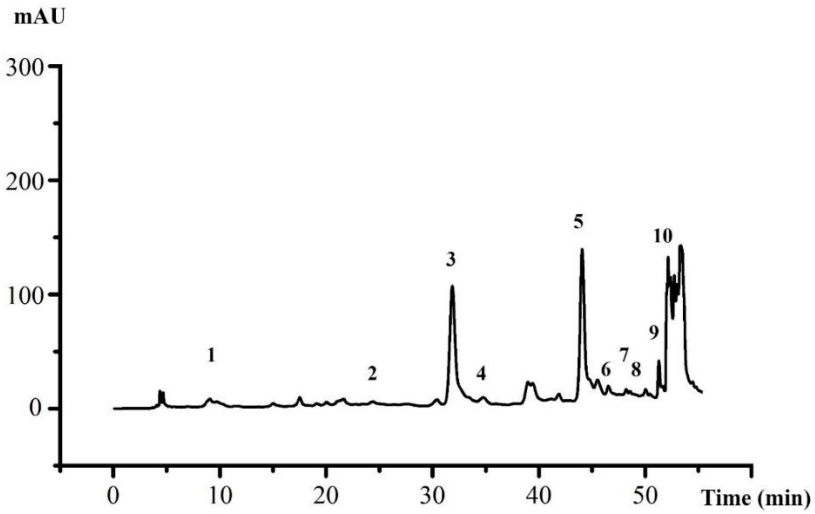
ทำการวิเคราะห์หาปริมาณปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดโดยเทียบกับสารมาตรฐานจำนวน 10 ชนิด คือ gallic acid, catechin, epicatechin (ตรวจวัดที่ 280 nm), caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, resveratrol, rutin, myricetin และ quercetin (ตรวจวัดที่ 306 nm) ดังแสดงในรูปที่ 4.1 รูปแบบการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 1 ที่วิเคราะห์ได้ แสดงดังรูปที่ 4.2 ส่วนรูปแบบการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 แสดงดังรูปที่ 4.3 และผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่า ในบรรดาสารทั้ง 10 ชนิดที่ตรวจสอบ มีสารจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ gallic acid, catechin, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, resveratrol, rutin, myricetin และ quercetin พบในสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มากกว่าสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 1 ยกเว้น epicatechin อย่างไรก็ตาม ปริมาณที่ตรวจพบนี้อยู่ในช่วงที่ตรวจพบในผักและผลไม้หลายชนิดที่เคยมีรายงานมาก่อน (Robbins, 2003; Fu et al., 2010) ที่คาดว่าน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง (Petr et al., 2008; Max et al., 2010)

quercetin, *p*-coumaric acid และ catechin คือ สารหลักที่พบในสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 ในขณะที่สายพันธุ์ขอนแก่น 1 จะพบ epicatechin, quercetin และ *p*-coumaric acid ตามลำดับ และทั้ง 2 สายพันธุ์พบ gallic acid ในปริมาณปานกลาง ซึ่งปริมาณที่พบนี้คล้ายกับที่เคยมีรายงานมาก่อนที่พบว่า proanthocyanidin จะพบสารสองชนิด คือ catechin และ epicatechin ปริมาณสูงในพืช (Perumalla and Hettiarachchy, 2011) ส่วน flavonol คือ rutin และ myricetin พบในปริมาณต่ำแต่ก็อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับที่เคยศึกษาในพืชอื่น เช่น เมล็ดองุ่น (Burin et al., 2014) ส่วน resveratrol เป็นสารที่มักพบในผิวผลไม้ (Yilmaz and Toledo, 2004) ซึ่งในสารสกัดจากชานอ้อยก็ตรวจพบได้เช่นกัน ถือเป็นเรื่องดีที่ค้นพบในการศึกษาครั้งนี้

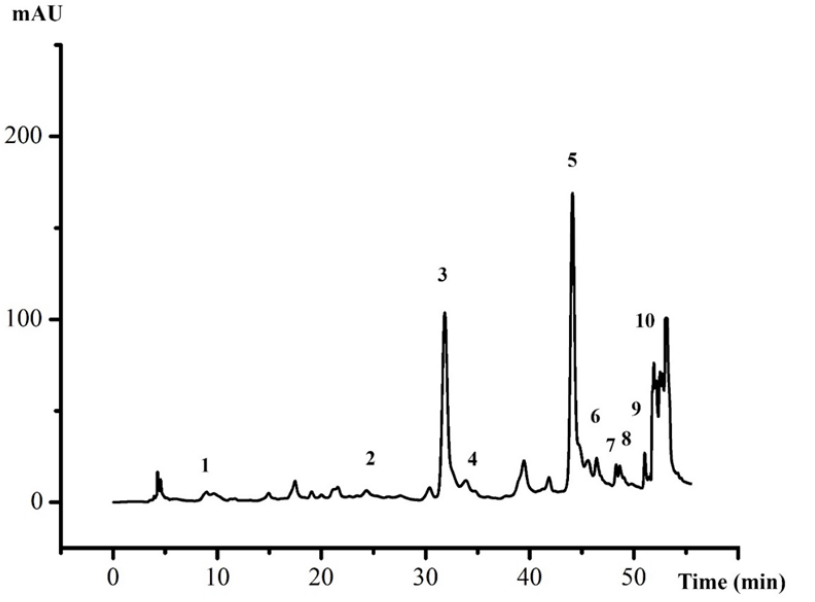
มีงานวิจัยจำนวนมาก ที่รายงานว่าปริมาณและชนิดของสารพฤกษเคมีจะแตกต่างกันตามปัจจัยหลายอย่าง เช่น พื้นที่ สภาพภูมิอากาศ สายพันธุ์ ส่วนของพืชที่นำมาศึกษา ระยะการเก็บเกี่ยว เครื่องมือ และวิธีการที่ใช้ศึกษา (Benzie and Szeto, 1999; Pyo, Lee and Rosen, 2003; Bruno and Sparapano, 2007; Szakiel et al., 2012; Boonsod et al., 2014; Feng et al., 2014; Lee et al., 2018)



รูปที่ 4.1 HPLC โครมาโทแกรม (ความยาวคลื่น 280 nm, 306 nm, 320 nm and 360 nm) ของสารมาตรฐาน: (1) gallic acid, (2) catechin, (3) caffeic acid, (4) epicatechin, (5) p-coumaric acid, (6) ferulic acid, (7) rutin, (8) myricetin, (9) resveratol, and (10) quercetin.



รูปที่ 4.2 HPLC โครมาโทแกรม (ความยาวคลื่น 280 nm) ของสารสกัดจากชานอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 1



รูปที่ 4.3 HPLC โครมาโทแกรม (ความยาวคลื่น 280 nm) ของสารสกัดจากชานอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 2

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดจากชานอ้อยเมื่อตรวจสอบด้วย HPLC

	Extracts	
	Khon Kaen 1 (mg/mL)	Khon Kaen 2 (mg/mL)
Gallic acid	0.48 ± 0.01	0.61 ± 0.01
Caffeic acid	0.19 ± 0.00	0.24 ± 0.00
p-Coumaric acid	1.06 ± 0.04	1.91 ± 0.16
Ferulic acid	0.12 ± 0.00	0.26 ± 0.01
Resveratrol	0.10 ± 0.00	0.14 ± 0.01
Catechin	0.69 ± 0.01	1.24 ± 0.13
Epicatechin	2.38 ± 0.16	0.71 ± 0.09
Rutin	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Myricetin	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.01
Quercetin	1.23 ± 0.05	2.02 ± 0.0
Total	6.39 ± 0.24	7.40 ± 0.09

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

1. ชานอ้อยประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด แต่มีปริมาณแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของอ้อย โดยสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากชานอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 1

2. สารพฤกษเคมีที่ตรวจสอบมีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อกันค่อนข้างสูงจึงเสริมฤทธิ์กันในการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน

3. วิธี DPPH เหมาะสำหรับตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ในขณะที่วิธี ABTS เหมาะสำหรับตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไตรเทอร์พีนอยด์ และวิธีรีดิวซ์โลหะไอรอนเหมาะสำหรับตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสเตอรอล

4. สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase สูงกว่าเอนไซม์ tyrosinase ในขณะที่ สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 1 มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase สูงกว่าเอนไซม์ α-glucosidase แต่สารสกัดจากอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์มีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน

5. สารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 2 มีปริมาณสารพฤกษเคมีมากกว่าสารสกัดจากชานอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 1 ยกเว้น epicatechin เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC

6. ชานอ้อยเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีและยังตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด ซึ่งมีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพและช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Abbas, S.R., Sabir, S.M., Ahmad, S.D., Boligon, A.A., Athayde, M.L. (2014). Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Food Chemistry,* 147, 10-16.

Ali, S.E., El Gedaily R.A., Mocan, A., Farag, M.A., El-Seedi, H.R. (2019). Profiling metabolites and biological activities of sugarcane (*Saccharum officinarum* Linn.) juice and its product molasses via a multiplex metabolomics approach. *Molecules,* 24, 1-21.

Almeida, J.M.D., Salatino, A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chemistry,* 125, 660-664.

Antoniolli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, *178*, 172–178. https://doi.org/10.1016/ J.foodchem.2015.01.082

Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N. (2003). Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity. Research,* 5, 165-176.

Asikin, Y., Hirose, N., Tamaki, H., Ito, S., Oku, H., & Wada, K. (2016). Effects of different drying-solidification processes on physical properties, volatile fraction, and antioxidant activity of non-centrifugal cane brown sugar. *LWT-Food Science and Technology,* 66, 340-347.

Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, *72*(6), 435–457. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015

Benzie, I.F.F. and Szeto, Y.T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric derucing/ antioxidant power assay. *Agricultural and Food Chemistry*, 47, 633-636.

Boonsod, Y., Sangdee, A. and Srihanam, P. (2014). Phytochemical and biological activities of the wild grape fruit extracts using different solvents. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(1), 23-36.

Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 221–247. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x

Bruno, G. and Sparapano, L. (2007). Effects of three esca-associated fungi on Vitis vinifera L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6), 210-229.

Burin, V.M., Ferreira-Lima, N.E., Panceri, C.P. and Bordignon-Luiz, M.T. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of Vitis vinifera and Vitis labrusca grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, 155-163.

Butsat, S. and Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119(2), 606-613.

Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Canovas, F., Acosta, M. and Arnao, M.B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis*, 9(4), 196-202.

Cappellari, O., Benedetti, S., Innocenzi, A., Tedesco, F.S., Moreno-Fortuny, A., Ugarte, G., Lampugnani, M.G., Messina, G., Cossu, G. (2013). Dll4 and PDGF-BB convert committed skeletal myoblasts to pericytes without erasing their myogenic memory . *Dev Cell,* 25-26(6), 586-99.

Chaudiere, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, *37*(9–10), 949–962. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00090-3

Colombo, R., Lancas, F. M., Yariwake J. H. (2006). Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. *Journal of Chromatography A,* 118-124.

Coutinho, I.D., Baker, J.M., Ward, J.L., Beale, M.H., Creste, S., Cavalheiro, A.J. (2016). Profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. *Food Chemistry,* 64, 4198-4206.

Curini, M., Cravotto, G., Epifano, F., & Giannone, G. (2006). Chemistry and biological activity of natural and synthetic. *Current Medicinal Chemistry*, *13*, 199–222.

Custodio, L., Patarra, J., Albericio, F., Neng, N.R., Nogueira, J.M., Romano, A. (2015). In vitro antioxidant and inhibitory activity of water decoctions of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) on cholinesterases, alpha-amylase and alpha-glucosidase. *Natural. Product. Research,* 29, 2155-2159.

Decker, H., Tuczek, F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends in Biochemical. Sciences,* 25, 392-397.

Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., & Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry,* 84(1), 99-105.

Dias, C., Domínguez-Perles, R., Aires, A., Teixeira, A., Rosa, E., Barros, A., & Saavedra, M. J. (2015). Phytochemistry and activity against digestive pathogens of grape (Vitis vinifera L.) stem's (poly)phenolic extracts. *LWT - Food Science and Technology*, *61*(1), 25–32. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.033

Doughari, J.H., Human, I.S., Bennade, S., & Ndakidemi, P.A. (2009). Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research,* 3(11), 839-848.

Duarte-Almeida, J.M., Negri, G., Salatino, A., de Carvalho, J.E., & Lajolo, F.M. (2007). Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry,* 68(8), 1165-1171.

Duarte-Almeida, J.M., Salatino, A., Genovese, M.I., & Lajolo, F.M. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum*) products. *Food Chemistry,* 125(2), 660-664.

Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature,* 405, 903.

El-Beltagi, H. S., & Mohamed, H. I. (2013). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *41*(1), 44–57.

Fan, M., Zhang, G., Hu, X., Xu, X., Gong, D. (2017). Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. *Food Research. International,* 100, 226-233.

Feng, S., Luo, Z., Zhang, Y., Zhong, Z., & Lu, B. (2014). Phytochemical contents and antioxidant capacities of different parts of two sugarcane (Saccharum officinarum L.) cultivars. *Food Chemistry*, *151*, 452–458. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.057

Forman, H. J., Davies, K. J. A., & Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, *66*, 24–35. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045

Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Qin, X.S., Gan, R.Y., & Li, H.B. (2010). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules,* 15(12), 8602-8617.

Georges, P., Sylvestre, M., Ruegger, H., & Bourgeois, P. (2006). Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. *Steroids*, *71*(8), 647–652. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.01.016

Gonzalez-Castejón, M., & Rodriguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research*, *64*(5), 438–455. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.07.004

Gou, L., Lee, J., Hao, H., Park, Y., Zhan, Y., Lu, Z. (2017). The effect of oxaloacetic acid on tyrosinase activity and structure: integration of inhibition kinetics with docking simulation. *International Journal of Biomacromolecules,* 101, 59-66.

Guerra, M.J., & Mujica, M.V. (2010). Physical and chemical properties of granulated canesugar “Panelas”. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos,* 30(1), 250-257.

Hou, W. C., Lee, M. H., Chen, H. J., Liang, W. L., Han, C. H., Liu, Y. W., & Lin, Y. H. (2001). Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (Dioscorea batatas Decne) tuber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4956–4960. https://doi.org/10.1021/jf010606m

Hwang, H., Chen, T., Nines, R. G., Shin, H. C., & Stoner, G. D. (2006). Photochemoprevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. *International Journal of Cancer*, *119*(12), 2742–2749. https://doi.org/10.1002/ijc.22147

Jimenez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Sanchez-Moreno, C., & Saura-Calixto, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Sci Food Agric*, 80(11), 1686–1690.

Kadam, U.S., Ghosh, S.B., De, S., & Suprasanna, P. (2008). Antioxidant activity in sugarcane juice and its protective role against radiation induced DNA damage. *Food Chemistry,* 106, 1154-1160.

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., et al. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47(10), 3954-3962.

Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(13), 3713–3717. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12059148

Kim, J.S., Kwon, C.S., Son, K.H. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry,* 64, 2458-2461.

Lagarda, M.J., Garcia-Llatas, G., & Farre, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 41(5), 1486-1496.

Lee, J.S., Ramalingam, S., Jo, I.G., Kwon, Y.S., Bahuguna, A., Oh, Y.S., Kwon, O-J., Kim, M. (2018) . Comparative study of the physicochemical, nutritional, and antioxidant properties of some commercial refined and non-centrifugal sugars. *Food Research International,* 109, 614-625.

Lessin, W. J., & Schwartz, S. J. (2002). Quantification of cis-trans Isomers of Provitamin A Carotenoids in Fresh and Processed Fruits and Vegetables . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(10), 3728–3732. https://doi.org/10.1021/jf960803z

Li, Z., Jiang, H., Xu, C., & Gu, L. (2015). A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, *43*, 153–164. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.010

Lopes, G.B., Schulman, H.M. and Lima, M.H. (1999). Polyphenol tannic acid inhibition radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. Biochimica Biophysica Acta, 1426, 475-482.

Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., … Eming, S. A. (2010). Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology*, *184*(7), 3964–3977. https://doi.org/ 10.4049/jimmunol.0903356

Max, B., Salgado, J.M., Cortes, S., & Dominguez, J.M. (2010). Extraction of phenolic Acids by alkaline hydrolysis from the solid residue obtained after prehydrolysis of trimming vine shoots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 58(3), 1909-1917.

Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A., & Alam, A. (2014). Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(6), 1125–1140. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12106

Medini, F., Bourgou, S., Lalancette, K. G., Snoussi, M., Mkadmini, K., Coté, I., … Ksouri, R. (2015). Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte Limonium densiflorum extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany*, *99*, 158–164. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.04.007

Meng, J. F., Fang, Y. L., Qin, M. Y., Zhuang, X. F., & Zhang, Z. W. (2012). Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (Vitis davidii Foex) in Chongyi County (China). *Food Chemistry*, *134*(4), 2049–2056. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.005

Mira, A., Syeda, S., Farhana, I., Dilara, F., Rasheda, A., Dilruba, N., et al. (2011). A survey of medicinal plants used by the traditional medicinal practitioners of Khulna City, Bangladesh. *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture,* 5, 177-195.

Mohammed, S., Klimoski, R., & Rentsch, J. R. (2000). The Measurement of Team Mental Models: We Have No Shared Schema. *Organizational Research Methods*, *3*(2), 123–165. https://doi.org/10.1177/109442810032001

Mohdaly, A.A.A., Hassanien, M.F.R., Mahmoud, A., Sarhan, M.A., & Smetanska, I. (2013). Phenolics extracted from potato, sugar beet, and sesame processing by products. *International Journal of Food Properties,* 16(5), 1148-1168.

M.R. Patlolla, J., & V. Rao, C. (2011). Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(1), 147–155. https://doi.org/10.2174/138920112798868719

Mukhtar, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, R. J., Wigdahl, B., & Parveen, Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research*, *131*(2), 111–120. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.008

Naik, G.H., Priyadarsini, K.I. and Satav, J.G. (2003). Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in ayurvedic medicine. *Phytochemistry*, 63, 97-104.

Nakasone, Y., Takara, K., Wada, K., Tanaka, J., Yogi, S., & Nakatani, N. (1996). Antioxidative compounds isolated from kokuto, non-centrifuged cane sugar. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,* 60(10), 1714-1716.

Niju, S., & Swathika, M. (2019). Delignification of sugarcane bagasse using pretreatment strategies for bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,* 20, 101-263.

Nisa, H., Kamili, A. N., Nawchoo, I. A., Shafi, S., Shameem, N., & Bandh, S. A. (2015). Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis*, *82*, 50–59. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.04.001

Ni, Q.X., Xu, G.Z., Wang, Z.Q., Gao, Q.X., Wang, S., & Zhang, Y.Z. (2012). Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo sasa argenteastriatus leaves. *International Journal of Molecular Science,* 13(2) , 2249-2262.

Ni, Q., Xu, G., Wang, Z., Gao, Q., Wang, S., & Zhang, Y. (2012). Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo Sasa argenteastriatus leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(2), 2249–2262. https://doi.org/10.3390/ijms13022249

Onyeka, E., & Nwambekwe, I.O. (2007). Phytochemical profile of some greenleafy vegetables in South-East Nigeria. *Nigerian Food Journal,* 25(1), 67-72.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, *74*, 10–36. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018

Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, *51*(2), 954–970. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T. (2000). Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource. Technology,* 74, 69-80.

Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Bae, H. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy. Research,* 21, 805-816.

Petr, J., Vitkova, K., Ranc, V., Znaleziona, J., Maier, V., Knob, R., & Sevcik, J. (2008). Determination of some phenolic acids in Majorana hortensis by capillary electrophoresis with online electrokinetic preconcentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 56(11), 3940-3944.

Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science,* 4(2), 89-96.

Pinheiro, F.G.C., Soares, A.K.L., Santaella, S.T., Silva, L.M.A.E., Canuto, K.M., Caceres, C.A., Rosa, M.D.F., Feitosa, J.P.D.A., Leitao, R.C. (2017). Optimization of the extraction of lignin from sugarcane bagasse for phenolic resin production. *Industrial. Crops and Products,* 96, 80-90.

Plat, J., & Mensink, R.P. (2001). Effects of plant sterols and stanols on lipid Metabolism and cardiovascular risk. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases,* 11(1), 31-40.

Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 622–625. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.003

Pradeep, P. M., & Sreerama, Y. N. (2015). Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. *Food Chemistry*, *169*, 455–463. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.010

Pulido, R., Bravo, L. and Calixto, F.S. (2000). Antioxidant activity of dietary Polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Agricultural and Food Chemistry*, 48, 653-657.

Pulido R., Bravo L., and S.C. v. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. Journal of Agricultural and. *Food Chemistry*, *48*, 3396–3402. https://doi.org/10.1021/jf9913458

Re, R., Pellegrini, N., Proteggenete, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Trolox ASSAY. *International Antioxidant Research Centre, Guy's, King's and St Thomas' School of Biomedical Sciences, Kings College–Guy's Campus, London SE1 9RT, UK*, *26*(98), Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, Nos. 9/1. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Rhodes, M.J.C., Price, K.R. (1996). Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. *Food Chemistry,* 57, 113-117.

Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chemistry,* 51(10), 2866-2887.

Romano, M., Cianci, E., Simiele, F., & Recchiuti, A. (2015). Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. *European Journal of Pharmacology*, *760*, 49–63. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.083

Said, O., Fulder, S., Khalil, K., Azaizeh, H., Kassis, E., Saad, B. (2008). Maintaining a physiological blood glucose level with "glucolevel" a combination of four anti-diabetes plants used in the traditional Arab herbal medicine. *Evidence. Based Complementary and Alternative Medicine,* 5, 421-428.

Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, *20*(7), 941–953. https://doi.org/ 10.1016/S0271-5317(00)00185-8

Sari, S., Barut, B., Ozel, A., Kuruuzum-Uz, A., Sohretoglu, D. (2019). Tyrosinase and α-glucosidase inhibitory potential of compounds isolated from Quercus coccifera bark: In vitro and in silico perspectives. *Bioorganic Chemistry,* 86, 296-304.

Sari, S., Barut, B., Ozel, A., Sohretoglu, D. (2019). Tyrosinase inhibitory effects of Vinca major and its secondary metabolites: Enzyme kinetics and in silico inhibition model of the metabolites validated by pharmacophore modelling. *Bioorganic Chemistry,* 92, 103-259.

Segui, L., Laura, C.J., Betoret, N., & Fito, P. (2015). Physicochemical and antioxidant properties of non-refined sugarcane alternatives to white sugar. *International Journal of Food Science and Technology,* 50(12), 2579-2588.

Sharma, N. (2014). Free radicals, antioxidants and disease. *Biology and Medicine*, *6*(3), 1–6. https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000214

Shukla, S., Meeran, S. M., & Katiyar, S. K. (2014). Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Cancer Letters*, *355*(1), 9–17. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.017

Si, Y.X., Yin, S.J., Oh, S., Wang, Z.J., Ye, S., Yan, L., Yang, J.M., Park, Y.D., Lee, J., Qian, G.Y. (2012). An integrated study of tyrosinase inhibition by rutin: progress using a computational simulation. *Journal of Biomolecular. Structure and Dynamics,* 29, 999-1012.

Sparg, S. G., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*(2–3), 219–243. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016

Sun, J.X., Sun, X.F., Zhao, H., Sun, R.C. (2004). Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer,* 84, 331-339.

Szakiel, A., Paczkowski, C., Pensec, F. and Bertsch, C. (2012). Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3), 263-284.

Takara, K., Matsui, D., Wada, K., Ichiba, T., & Nakasone, Y. (2002). New antioxidative phenolic glycosides isolated from Kokuto non-centrifuged cane sugar. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,* 66(1), 29-35.

Takara, K., Otsuka, K., Wada, K., Iwasaki, H., & Yamashita, M. (2007). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory effects of constituents of sugarcane molasses. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry,* 71(1), 183-191.

Thaipong, K., Boonprakob, 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.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6–7), 669–675. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003

Van Den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., Van Den Berg, H., & Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, *66*(4), 511–517. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00089-8

Visioli, F., Lastra, C.A., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C. and Cassano, A. (2011). Polyphenols and human health: a prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 524-546.

Willcox, J.K., Catignani, G.L., Lazarus, S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Critical. Reviews in Food Science and Nutrition,* 43, 1-18.

Wink, M. (2008). Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism*, *9*(10), 996–1009. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075616

Xu, F., Sun, J.X., Liu, C.F., He, B.H., Fan, J.S. (2005). Determination of cell wall ferulic and *p*-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Analytica. Chimica. Acta,* 552, 207-217.

Xu, Y., Stokes, A., Freeman, W., Kumer, S.C., Vogt, B.A., Vrana, K.E. (1997). Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Molecular. Brain Research,* 45, 159-162.

Yang, J., Martinson, T. E., & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, *116*(1), 332–339. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.021

Yilmaz, Y. and Toledo, R.T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 255-260.

Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., Richard, S., Quignard, J.F., Gross, R., Petit, P., Bataille, D., Oiry, C. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology,* 161, 799-814.

Yu, D., Wild, C. T., Martin, D. E., Morris-Natschke, S. L., Chen, C.-H., Allaway, G. P., & Lee, K.-H. (2005). The discovery of a class of novel HIV-1 maturation inhibitors and their potential in the therapy of HIV. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *14*(6), 681–693. https://doi.org/10.1517/13543784.14.6.681

Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Phamacol Research,* 57(4), 387-95.

Zhang, H., Jiang, L., Ye, S., Ye, Y.B., & Ren, F.Z. (2010). Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissue of jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) from China. *Food and chemical Toxicology,* 48(6), 1461-1465.

Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., Wang, M., Song, H., Liu, X., Lu, B. (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry,* 276, 538-546.

Zhang, L., Zhao, X., Tao, G., Chen, J., Zheng, Z. (2017). Investigating the inhibitory activity and mechanism differences between norartocarpetin and luteolin for tyrosinase: a combinatory kinetic study and computational simulation analysis. *Food Chemistry,* 223, 40-48.

Zhang, R., Zeng, Q., Deng, Y., Zhang, M., Wei, Z., Zhang, Y., & Tang, X. (2013). Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. *Food Chemistry*, *136*(3–4), 1169–1176. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.085

Zheng R., Su S., Zhou H., Yan H., Ye J., Zhao Z., You L., Fu X. (2017). Antioxidant/ antihyperglycemic of phenolics from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse and identification by UHPLC-HR-TOFMS. *Industrial Crops and Products 101,* 104-114.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวปนัดดา เสนารัตน์
วันเกิด	วันที่ 20 เดือนธันวาคม พุทธศักราช 2537
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่16 ถนนเทวาภิบาล ซอย 13 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด 45000
ประวัติการศึกษา	พุทธศักราช 2560 ปริญญาตรี (คบ.) สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด พุทธศักราช 2563 ศึกษาระดับปริญญาโท (วท.ม.) สาขาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

พหูน ปณฺ ฑิโต ชีเว