อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination

บุหรัน พันธุ์สวรรค์*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

Buran Phansawan*

Division of Environmental Science, School of Energy and Environment, University of Phayao,

Maeka, Mueang, Phayao 56000

บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระหมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ โรคชรา โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา เกิดความผิดปกติของปอด และระบบประสาท เป็นต้น ธรรมชาติหรือร่างกายของสิ่งมีชีวิตจึงมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งกลไกในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การเสริมฤทธิ์ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ ทั้งนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและปริมาณมีหลายวิธีด้วยกัน แต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน ปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผลทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพที่นิยม ได้แก่ การทำให้เกิดสีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ส่วนวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช การฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ วิธีที่ได้นำเสนอในบทความนี้ถือได้ว่าเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด

คำสำคัญ : อนุมูลอิสระ, สารต้านอนุมูลอิสระ, การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** buranphan@hotmail.com

Abstract

Free radicals are atoms or molecules with unpaired electrons. Many diseases are caused by free radicals, for instance, aging, cancer, coronary heart disease, Alzheimer's disease, arthritis, allergies, high blood pressure, gum disease, eye problems, lung abnormality and nervous system abnormality. Normally free radical formation is controlled naturally by various beneficial compounds known as antioxidants. There are many mechanisms related to antioxidant activity, such as radical scavenging, singlet oxygen quenching, metal chelation, free radical chain breaking, synergism and enzyme inhibition. Antioxidants can be classified into natural and synthetic groups. Moreover, several analytical methods have been used for qualitative and quantitative determination of antioxidants, and each has its own specificity. Accuracy and precision of analysis is generally confirmed by various methods. The qualitative methods for determination of antioxidants include colorimetric assay, thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The quantitative methods for antioxidant determination include diphenyl-picryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, ABTS radical cation decolorization assay and ferric ion reducing antioxidant power assay. The proposed method is a simple, convenient and rapid that can be applied to various types of samples.

Key words: free radicals, antioxidants, antioxidant activity determination

1. บทนำ

มนุษย์เราให้ความสนใจและเอาใจใส่เกี่ยวกับเรื่องสุขภาพกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการรับประทานอาหารของมนุษย์เราในปัจจุบันพบว่ามีความเสี่ยงต่อโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น การรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นประจำจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ หลอดเลือดแข็งตัว และมะเร็ง ขณะที่ผู้รับประทานอาหารประเภทพืชผักและผลไม้เป็นประจำมีความเสี่ยงน้อยกว่า โดยพืชผักและผลไม้มีวิตามินและเกลือแร่ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้แก่ เบต้าคาโรทีน วิตามินซี วิตามินอี ทองแดง สังกะสี และแมงกานีส เป็นต้น ในขณะที่เนื้อสัตว์มีของเสียที่เกิดจากขบวนการเผาผลาญอาหารที่เรียกว่า "อนุมูลอิสระ" (free radical) เป็นจำนวนมาก โดยอนุมูลอิสระเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย รวมถึงจากมลพิษต่าง ๆ เช่น โอโซน โลหะหนัก ควันบุหรี่ อนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายโครงสร้าง และหน้าที่ของผนังเซลล์ ก่อให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ เช่น โรคชรา (แก่ก่อนวัย) โรคหลอดเลือดและหัวใจขาดเลือด ผนังหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) โรคเสื่อมของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย รวมถึงการกลายพันธุ์ (mutation) ของเซลล์ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ ร่างกายของเราจึงมีกลไกในการควบคุมสารนี้และผลผลิตของสารอนุมูลอิสระเพื่อไม่ให้ลุกลาม ร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สาร 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ในร่างกายเราที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระมีอยู่อย่างจำกัด เราจึงต้องรับประทานสารกำจัดอนุมูลอิสระพวกที่ไม่ใช่เอนไซม์ สารดังกล่าว ได้แก่ สารต้าน

อนุมูลอิสระ หรือมีอีกชื่อว่า “Antioxidant” สารต้านอนุมูลอิสระมีมากในพืชผักและผลไม้บางชนิด จึงได้มีการสนับสนุนให้รับประทานสิ่งเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาสารที่ส่งเสริมสุขภาพจึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะงานวิจัยเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักและผลไม้ทั้งที่รับประทานกันอยู่ทั่วไปและประจำท้องถิ่น วิธีการตรวจวัดชนิดและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากวิธีการตรวจวัดที่ดีและเหมาะสมจะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง เที่ยงตรง และแม่นยำ บทความวิชาการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็นที่นิยม เพื่อนำไปสู่การส่งเสริม การอนุรักษ์ การรู้คุณค่าและประโยชน์ของพืชผักและผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอีกทางหนึ่ง

2. อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \quad \text{(สมการ 1)}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \quad \text{(สมการ 2)}$$

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, transition metals (โลหะทรานซิชัน), carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$), nitrate radical ($NO_3^{\bullet}$), methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), superoxide radical ($O_2^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น [1] นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน (collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer’s disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น [2] อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่

แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียม ไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol) [3]

3. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ 3 และ 4 [4]

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \quad \text{(สมการ 3)}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \quad \text{(สมการ 4)}$$

โดย $R^{\bullet}$ และ $RO^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค [5] ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ glutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึมและเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน $O_2^{\bullet-}$ เป็น H_2O_2 สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ [6]

ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไป จำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวได้จากพืชผักและผลไม้ [4] ตัวอย่างอาหารที่มีเบต้าแคโรทีนสูง ได้แก่ ผักใบเขียว เช่น ตำลึง และผักบุ้ง อาหารที่มีสีเหลือง เช่น แครอท มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง อาหารที่มีวิตามินซี (vitamin C หรือ ascorbic acid) สูง ได้แก่ พืช ผักสีเขียว และผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง พริกหยวก ฝรั่ง มะขามป้อม ส้ม มะนาว สับปะรด (วิตามินซีจากพืชผักดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่แรงมากและละลายน้ำได้ดี) วิตามินอี (vitamin E หรือ tocopherol) ละลายได้ดีในน้ำมัน โดยวิตามินอีมีในน้ำมันจากเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ เช่น รำละเอียดในพวกธัญพืชที่ไม่ขัดขาว ข้าวโพด ข้าวกล้อง ถั่วแดง ถั่วเหลือง ผักกาดหอม เมล็ดทานตะวัน งา น้ำมันรำ [6]

4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสมารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

4.1 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ (เช่น Shinoda test และ Pew test) โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

4.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยการทำให้เกิดสี (colorimetric assay) เป็นวิธีการนำสารเคมีชนิดต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และดูสีที่เกิดขึ้นหลังจากการเกิดปฏิกิริยา [7] ตัวอย่างของวิธีนี้ ได้แก่

(1) วิธี Shinoda test เป็นการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (cyanidins reaction) โดยการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างกับผงแมกนีเซียมหรือวงแหวนแมกนีเซียม (magnesium ribbon) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และออกทิลแอลกอฮอล์ (octyl alcohol) ซึ่งจะเกิดการแยกชั้น ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีสารจำพวกฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาวาโนน (flavanone) ฟลาวาโนนอล (flavanonol) หรือแซนโทน (xanthone) หรือถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีสารจำพวกฟลาโวน (flavones) ชาลโคน (chalcone) หรือออโรน (ourone)

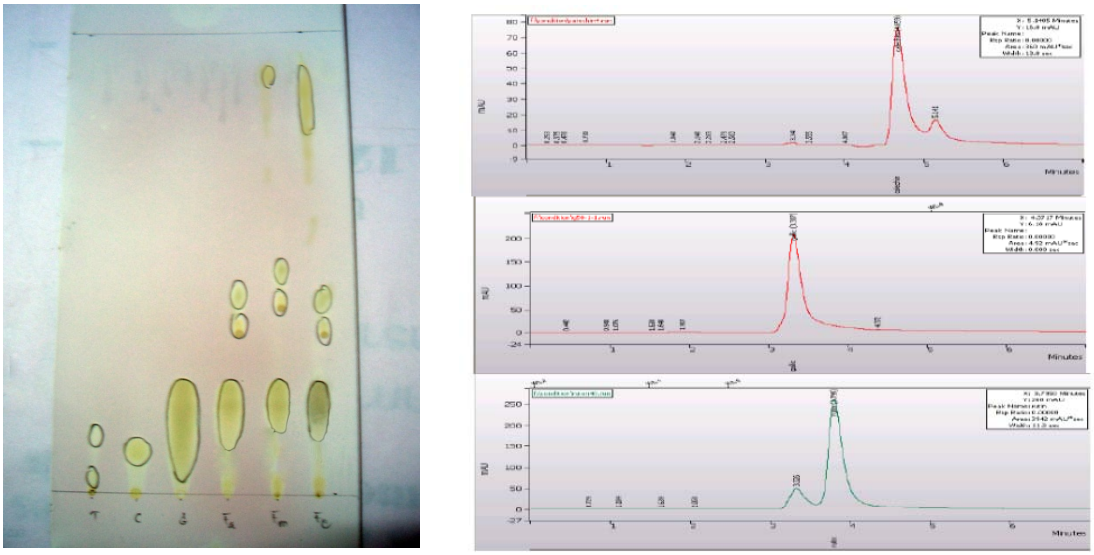
(2) วิธี Pew test หรือการทดสอบของพิว เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับผงสังกะสี (zinc dust) และกรดไฮโดรคลอริก ถ้าเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามีสารฟลาวาโนนอล

(flavanonol) และฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ (flavonol-3-glycoside) แต่ถ้าเป็นสีจาง ๆ แสดงว่ามีสารฟลาวาโนน (flavanone) และฟลาโวนอล (flavonol)

วิธีการทั้งสองมีข้อดี คือ ทำได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อน และใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แต่มีข้อเสีย คือ มีความไว (sensitivity) และความแม่นยำ (precision) ต่ำ และเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ เพราะสารหลาย ๆ ชนิดอยู่ด้วยกัน สีที่เกิดขึ้นสามารถรบกวนกันได้ วิธีการดังกล่าวข้างต้นได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาสารโพลีฟีนอลตัวอย่าง เช่น เกสรตัวผู้ของบัวหลวง [8] และย่านาง [9] พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารและวิเคราะห์สารโพลีฟีนอลในเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารด้วยตัวทำละลายหรือตัวพา (mobile phase) กับการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ (adsorbent หรือ stationary phase) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างกับตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่างในแต่ละชนิด สารตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกละลายและถูดดูดซับได้ไม่เท่ากัน โดยสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่เร็ว ค่า R_f เข้าใกล้ 1.0 (R_f = ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ส่วนสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ค่า R_f จะเข้าใกล้ 0 ซึ่งตัวดูดซับที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจล และตัวทำละลายหรือตัวพาที่นำมาใช้ในการแยกสารมีหลายชนิด ทั้งนี้อาจมีการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด ตัวอย่างของตัวทำละลาย เช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเทต กรดฟอร์มิก คลอโรฟอร์ม สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้วสามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ชาลโคน (chalcone) และออโรน (ourone) แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยาต่อกับไอของแอมโมเนีย หรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) หรือฉีดพ่นด้วยสารต่าง ๆ เช่น สารละลายโฟลิน สารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก สารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต สารละลายกิบบส์ (Gibbs reagent) และสารละลาย DPPH ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่าง สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี แต่มีข้อเสีย คือ มีความไวและความแม่นยำต่ำ และในกรณีที่องค์ประกอบต่าง ๆ ในตัวอย่างมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมาก จะไม่สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากกันได้ หรือแยกได้แต่ไม่บริสุทธิ์ ซึ่งตัวอย่างของการวิเคราะห์สารโพลีฟีนอลพบในย่านาง [9] และผักชำเลือด [10] โดยการใช้สารละลาย DPPH ฉีดพ่นบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางแสดงดังรูปที่ 1 (ก)

4.1.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ใช้หลักการคล้ายกับเทคนิคของ TLC โดยเครื่อง HPLC มีส่วนของปั๊มมาช่วยให้



(ก) (ข)

รูปที่ 1 (ก) แผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) ฉีดพ่นด้วยสารละลาย DPPH
(ข) โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน catechin, gallic acid และ rutin โดยการใช้เครื่อง HPLC

ตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และตัวดูดซับหรือเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) บรรจุเป็นทรงกลมเล็ก ๆ หรือเรียกว่าคอลัมน์ (column) โดยสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หรือ stationary phase ได้แตกต่างกัน คอลัมน์ต่างชนิดกันแยกสารได้แตกต่างกัน ซึ่งสารที่ถูกดูดซับได้น้อยจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาก่อน ส่วนสารที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทีหลัง องค์ประกอบอีกส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนตรวจวัดสัญญาณ (detector) มีหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณของสารตัวอย่างที่แยกออกมาแต่ละชนิด ซึ่งสัญญาณที่ตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค (peak) เรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram) โดยส่วนตรวจวัดสัญญาณสามารถตรวจวัดด้วย UV, fluorescence, IR เป็นต้น ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสารแตกต่างกัน การแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่อง HPLC สามารถตรวจหาสารได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณในเวลาเดียวกัน อีกทั้งสามารถหาสารหลายชนิดไปพร้อม ๆ กัน ทั้งนี้ต้องมีสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบโดยสารชนิดเดียวกันจะมีพีคออกมาในระยะเวลา (retention time) เดียวกันเสมอ ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน และวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำ ๆ แต่มีข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเครื่อง HPLC มีราคาค่อนข้างแพง และ mobile phase ต้องใช้ประเภท HPLC grade ตัวอย่างในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (catechin, gallic acid และ rutin) โดยใช้เครื่อง HPLC ในพืชผักแสดงดังรูปที่ 1 (ข) [6]

4.2 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้าน

อนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (เช่น trolox, vitamin C และ ferrous sulfate) หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ (1) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และ (2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 % (IC_{50}, 50 % of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ μM/mg, mM/mg, μM/mL, mM/mL เป็นต้น

4.2.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenyl-picryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ 5) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \quad \text{(สมการ 5)}$$

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรล็อกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ μM/mg ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว [11] ส่วนข้อเสีย คือ $DPPH^{\bullet}$ ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ [12] อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน [13] ได้มีการนำวิธีการนี้ไปใช้ ตัวอย่าง เช่น การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระในกระถิน ติ้ว และกระโดนบก พบว่าสารสกัดทั้งสามให้สารสกัดที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี [14] ขณะที่สารสกัดเมทานอลจากใบของชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แรงกว่าดอกและฝัก [15] เช่นเดียวกับใบของมะตูมมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (IC_{50}) มากกว่าผลและราก [16]

4.2.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการ 6) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง [11,17] ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ ตัวอย่างที่ได้มีการนำวิธีนี้มาใช้ได้แก่ การตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโหระพา [18] การตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนของเมล็ดมะม่วง (*Mangifera indica* L.) มากกว่าใบอ่อน ใบแก่และเปลือกของผลดิบ และพบว่าส่วนสกัดจากใบผักช้าเลือด (*Ceasalpinia mimosoides* Lamk.) มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนของยอดอ่อน ใบ ดอก และลำต้น [19] อีกทั้งได้มีการตรวจพบต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากโด่ไม่รู้ล้ม ผักคราดหัวแหวน หญ้าตดหมา เหียง [20] กะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่า เพกา และมะระขี้นก [6]

$$ABTS^{\bullet+} + AH\ (\text{antioxidant}) \rightarrow ABTS\ (\text{สีจางลง}) + A^{\bullet} \quad (\text{สมการ } 6)$$

4.2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ (ดังสมการ 7) ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ประกอบด้วย นำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเทตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม [12] แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยา

เคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีการดังกล่าว เช่น การตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเอทิลอะซิเทตและบิวทานอลของใบฝรั่ง [21] สารสกัดรังกะแท้ในประเทศจีนที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ [22] และสารสกัดเมทานอลและเอทิลอะซิเทตในพืชวงศ์ *Lamiaceae* และวงศ์ *Apiaceae* จำนวน 7 ชนิด จากประเทศอิหร่าน [23]

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+} \xrightarrow{\text{antioxidant}} [Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$$

(สมการ 7)

5. สรุป

อนุมูลอิสระหมายถึงอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมี เป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติทั้งภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งร่างกายของสิ่งมีชีวิตมีระบบต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การเสริมฤทธิ์ หรือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ แต่สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมีอยู่อย่างจำกัด จึงต้องอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกไม่ว่าจะเป็นสารจากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์เพื่อใช้ในการป้องกันหรือลดการเกิดอนุมูลอิสระ ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและปริมาณอย่างกว้างขวาง วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยการทำให้เกิดสี (เช่น Shinoda test และ Pew test) โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง HPLC ซึ่งวิธี Shinoda test, Pew test และ TLC เป็นวิธีที่ทำได้หลายสารตัวอย่างพร้อม ๆ กัน ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แต่มีข้อเสีย คือ sensitivity และ precision ต่ำ เหมาะสำหรับวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ ขณะที่เครื่อง HPLC สามารถใช้วิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณสารหลายชนิดได้พร้อมกัน และวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำ ๆ แต่มีค่าใช้จ่ายสูง ส่วนวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยม ได้แก่ DPPH radical scavenging assay, ABTS radical cation decolorization assay และ FRAP assay ทั้งสามวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว แต่มีข้อเสีย คือ DPPH radical scavenging assay ไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ และ FRAP assay สารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน ในแต่ละวิธีดังกล่าวข้างต้นมีความจำเพาะแตกต่างกันจึงต้องเลือกใช้วิธีให้เหมาะสมกับคุณลักษณะของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความว่องไว ถูกต้อง เที่ยงตรง และแม่นยำ ซึ่งวิธีที่ได้นำเสนอในบทความนี้สามารถนำไปประยุกต์กับตัวอย่างได้หลายชนิด เช่น สารสกัดจากพืช สารสังเคราะห์ ยา ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สิ่งส่งตรวจจากมนุษย์และสัตว์ และตัวอย่างอื่น ๆ

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Halliwell, B., 1999, Antioxidant defense mechanism: From the beginning to the end, Soc. Free Radic. Biol. Med. 31: 261-272.

[2] Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M., 1993, Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922.

[3] ไมตรี สุทธจิตต์, 2555, ความรู้พื้นฐานของออกซิเดชัน, น. 1-14, ใน วรพล เองวานิช (บรรณาธิการ), อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ร่วมกับ สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย, สำนักพิมพ์นวัตกรรมสุขภาพ, เชียงใหม่.

[4] เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554, อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา, ว.วิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ 1(1): 59-70.

[5] Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., 2001, Antioxidants in Food: Practical Applications, CRC Press, New York, 380 p.

[6] บุหรัน พันธุ์สวรรค์, ไมตรี สุทธจิตต์ และสุพักตร์ พ่วงบางโพ, 2553, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่า เพกา และมะระขี้นก ในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา, รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา, พะเยา, 34 น.

[7] กนกกาญจน์ พรหมน้อย และภักสิริ สินไชยกิจ, 2555, การวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอล, น. 9-19, ใน ชลธิชา เทพหนลัพ (บรรณาธิการ), เทคนิคในการตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ร่วมกับ สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย, บริษัท นพบุรีการพิมพ์ จำกัด, เชียงใหม่.

[8] ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, สุมนา ปานสมุทร, ดำรงค์ คงสวัสดิ์ และอำนวย เพชรประไพ, 2552, การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากบัวหลวง, รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ปทุมธานี, 92 น.

[9] บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์, 2549, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน, โครงการพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยมหิดล, นครปฐม, 51 น.

[10] บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2545, การศึกษาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระในผักช้าเลือด, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก, 101 น.

[11] พยุงศักดิ์ ตันติไพบูลย์วงศ์ และสุรศักดิ์ ใจเขียนดี, 2555, การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอชและการฟอกสีอนุมูลเอบีทีเอส, น. 21-26, ใน ชลธิชา เทพหนลัพ (บรรณาธิการ), เทคนิคในการตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ร่วมกับ สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย, บริษัท นพบุรีการพิมพ์ จำกัด, เชียงใหม่.

[12] ปรียนันท์ บัวสด, 2549, การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม, 228 น.

[13] Lee, V.S., Chen, C.R., Lio, Y.W., Tzen, J.T. and Chang, C.I., 2008, Structural determination and DPPH radical-scavenging activity of two acylated flavonoid tetraglycosides in oolong tea (*Camellia sinensis*), Chem. Pharm. Bull. 56: 851-853.

[14] ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์, 2548, การวิเคราะห์

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องเทศและสมุนไพรที่มีต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์อาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[15] Panichayupakaranant, P. and Kaewsuwan, S., 2004, Bioassay-guided isolation of antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves, Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 103-107.

[16] Siddique, N.A., Mujeeb, M., Najmi, A.K. and Akram, M., 2010, Evaluation of antioxidant activity, quantitative estimation of phenols and flavonoids in different parts of *Aegle marmelos*, African J. Plant Sci. 4: 1-5.

[17] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biol. Med. 26: 1231-1237.

[18] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivaco, J.M., 2003, Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum accessions*, Food Chem. 83: 547-550.

[19] สุพักตร์ พ่วงบางโพ, 2545, การตรวจหาฤทธิ์และสมบัติทางชีวเคมีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระในพืชผักพื้นบ้านที่พบในประเทศไทย, รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก, 89 น.

[20] เนวิชญานิ์ วุฒินิธิศานันท์, ไมตรี สุทธจิตต์, สุพักตร์ พ่วงบางโพ และบุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2552, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชผักและสมุนไพรพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา, รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา, พะเยา, 32 น.

[21] Tachakittirungrod, S., Okonogi, S. and Chowwanapoonpohn, S., 2007, Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract, Food Chem. 103: 381-388.

[22] Wei, S.D., Zhou, H.C. and Lin, Y.M., 2010, Antioxidant activities of extract and fractions from the hypocotyls of the mangrove plant *Kandelia candel*, Int. J. Mol. Sci. 11: 4080-4093.

[23] Gohari, A.R., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Ajani, Y. and Hadjiakhoondi, A., 2011, Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP assay, J. Med. Plants 10: 54-60.