



ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของพุทราไต้หวัน
พันธุ์ซื่อมี ในจังหวัดเชียงราย

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF TAIWANESE
JUJUBE (*Ziziphus jujuba* cv. Zimi) IN CHIANG RAI PROVINCE

วารินทร์ สารเขื่อนแก้ว

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร

สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของพุทราไต้หวัน
พันธุ์ซื่อมี ในจังหวัดเชียงราย

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF TAIWANESE
JUJUBE (*Ziziphus jujuba* cv. Zimi) IN CHIANG RAI PROVINCE

วารินทร์ สารเชื่อนแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร

สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของพุทราไต้หวัน
พันธุ์ซื่อมี ในจังหวัดเชียงราย

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF TAIWANESE
JUJUBE (*Ziziphus jujuba* cv. Zimi) IN CHIANG RAI PROVINCE

วารินทร์ สารเชื่อนแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร

2556

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุทธิวัลย์ สีทา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. นิรมล ปัญญาสุขกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. ชีรพงษ์ เทพกรณ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. วาริช ศรีละออง)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. นิรมล ปัญญาบุษกุล และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. ชีรพงษ์ เทพภรณ์ ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ และคำปรึกษา ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้มาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณพระคุณ ไร่มณเฑียร ต.แม่กรณ์ อ.เมือง จ.เชียงราย ที่ให้ความอนุเคราะห์ พุทธาพันธุ์ที่มีเป็นวัตถุดิบในการทำทดลอง ขอขอบคุณรุ่นพี่และน้องๆ นักศึกษาสำนักวิชา อุตสาหกรรมเกษตร รวมถึงนักวิทยาศาสตร์สาขาเทคโนโลยีการอาหารและสถาบันฯ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา นางสาว นามสมกร นายวิระพงษ์ สารเชื่อนแก้ว นายอินแถลง ธิมาขอม นายคณานนท์ ถิ่นลือธิ และนายภัทรกรภพ ภูโคกยาว ที่ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจในการศึกษาครั้งนี้

วารินทร์ สารเชื่อนแก้ว

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของพุทรา ได้หวันพันธุ์ชื้อมี ในจังหวัดเชียงราย
ชื่อผู้เขียน	วารินทร์ สารเชื่อนแก้ว
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการอาหาร)
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. นิรมล ปัญญ์บุษกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ชีรพงษ์ เทพกรณ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพุทราได้หวันพันธุ์ชื้อมีที่ปลูกในจังหวัดเชียงราย โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis, ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และปริมาณวิตามินซี) รวมทั้งศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดพุทรา ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย เวลาในการโซนิเคต (sonication time) และชนิดของตัวทำละลายที่ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณวิตามินซี) สูงสุด เพื่อนำไปสกัดสารสกัดพุทราเพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ DPPH radical scavenging activity และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ ด้วยวิธี disk diffusion method และวิธี broth microdilution method

จากการทดลองพบว่าพุทราเมืองมีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น ปริมาณเถ้า โปรตีน ไขมัน ใยอาหารหยาบ (crude fiber) และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 86.66, 1.05, 1.42, 0.04, 1.18 และ 10.83 ของน้ำหนักสด ตามลำดับ และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 13.13 องศาบริกซ์ ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ 0.02 กรัมในรูปของกรดซิตริกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และปริมาณวิตามินซี 32.12 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด สถานะในการสกัดที่ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดพุทราสูงสุด คือ อัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย 3 : 5 (w/w) ที่เวลาในการโซนิเคต

10 นาที และเอทานอลร้อยละ 50 (v/v) เป็นตัวทำละลาย โดยพบว่าสารสกัดจากพุทราที่ได้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1,721.59 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 530.91 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทิน และวิตามินซี 33.57 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิก ต่อตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน 8,759.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิก (FRAP assay) และ 2,591.30 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอคซ์ (DPPH assay) ต่อตัวอย่าง 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ทั้งสองวิธีพบว่า สารสกัดพุทราสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยพบว่าสารสกัดพุทราสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ เชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR1466 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *Listeria monocytogeneus* DMST17303 และเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR008 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดพุทราสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ คือ เชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR292 ได้น้อยที่สุด และยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* TISTR780 ได้มากกว่า *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพุทราที่มีศักยภาพที่จะใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันและสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติได้

คำสำคัญ: แบคทีเรียแกรมบวก/แบคทีเรียแกรมลบ/ฟีนอลิกทั้งหมด/ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด/วิตามินซี/สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ/ องค์ประกอบทางเคมี

Thesis Title	Antioxidant and Antimicrobial Activities of Taiwanese Jujube (<i>Ziziphus jujuba</i> cv. Zimi) in Chiang Rai Province
Author	Warin Sarnkhuankaew
Degree	Master of Science (Food Technology)
Advisor	Dr. Niramol Punbussakul
Co-Advisor	Dr. Theerapong Theppakorn

ABSTRACT

The aim of this work was, to study the antioxidant and antimicrobial activities of Taiwanese jujube (*Ziziphus jujuba* cv. Zimi) cultivated in Chiang Rai Province, Thailand. In this work, chemical composition including; proximate analysis, titratable acidity (TA), total soluble solid (TSS) and vitamin C were determined. Then, the extraction conditions (jujube-to-solvent ratio, sonication time and solvent for extraction) were optimized. Subsequently, the extraction condition providing the highest bioactive compounds (total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and vitamin C) was used for further jujube extract extraction. Then, the extract was subjected for the bioactive compounds, antioxidant activity (ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH radical scavenging activity (DPPH) assays) and antimicrobial activity (disk diffusion and broth microdilution methods) determination.

It was found that the moisture, ash, protein, lipid, crude fiber and carbohydrate content in the jujube were 86.66, 1.05, 1.42, 0.04, 1.18 and 10.83 % (fresh weight (FW)), respectively. TSS, TA and vitamin C content of the extract were 13.13 °Brix, 0.02 g citric acid and 32.12 mg/ 100 g FW, respectively. The condition provided the highest bioactive compounds in the extract were the jujube-to-solvent ratio of 3 : 5 (w/w) at the sonication time of 10 min using 50 % (v/v) ethanol

as a solvent. The TPC, TFC and vitamin C in the jujube extract were 1,721.59 mg gallic acid equivalent, 530.91 mg quercetin equivalent and 33.57 mg ascorbic acid/ 100 g dry weight (DW). The antioxidant activities of the extract were 8,759.54 mg ascorbic acid/ 100 g (DW) (FRAP assay) and 2,591.30 mg trolox equivalent/ 100 g DW (DPPH assay). The antimicrobial testing from both assays indicated that gram positive bacteria was more sensitive to the extract than gram negative bacteria. Among the tested gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus* TISTR1466 exhibited the most sensitive to the extract followed by *Listeria monocytogeneus* DMST17303 and *Bacillus subtilis* TISTR008, respectively. Whereas, *Salmonella typhimurium* TISTR292 was the most resistant bacteria among the gram negative bacteria. In addition, the higher inhibitory effect was found on *Escherichia coli* TISTR780 than *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781. These findings indicate that jujube extract could be one of the potential natural antioxidant and antimicrobial agents.

Keywords: Chemical composition/Gram-negative bacteria/Gram-positive bacteria/
Natural antimicrobial agent/Vitamin C/Total flavonoid/Total phenolic

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

พุทรา (*Jujube* spp.) อยู่ในวงศ์ Rhamnaceae (Williams, Smith, Haq & Dunsiger, 2006) มีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ประเทศจีน และแพร่หลายไปยังฟิลิปปินส์ อินเดีย แอฟริกา ฝรั่งเศส และสเปน (Popenoe, 2011) พุทราที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก มี 2 สายพันธุ์หลัก ๆ คือ พุทราอินเดีย (*Z. mauritiana* Lam.) และพุทราจีน (*Z. jujuba* Mill.) พุทราที่ปลูกในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์เจดีย์ พันธุ์เหรียญทอง เป็นต้น (นิตดา หงส์วิวัฒน์ และทวีทอง หงส์วิวัฒน์, 2552) สามารถปลูกพุทราได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดระยอง สมุทรสงคราม ลพบุรี อุทัย และสมุทรปราการ พันธุ์ที่ปลูกทางการค้า ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์เจดีย์ พันธุ์เหรียญทอง พันธุ์บอมเบย์ และพันธุ์ไต้หวัน โดยพุทราพันธุ์ไต้หวันที่ปลูกในไทยมีหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์ซื่อมี พันธุ์มิ่งเฉา และพันธุ์สามรส เป็นต้น (นิตดา หงส์วิวัฒน์ และทวีทอง หงส์วิวัฒน์, 2552) พุทราไต้หวันพันธุ์ซื่อมีถูกนำเข้ามาในประเทศไทยประมาณ 9 ปี นับจากปี พ.ศ. 2548 เป็นพุทราที่มีรูปทรงของผลเป็นทรงกระบอก หรือทรงยาว ขนาดของผลเมื่อโตเต็มที่จะมีน้ำหนัก 6 - 8 ผลต่อ กิโลกรัม เนื้อกรอบ ไม่ฝาด มีเส้นใยอาหารปริมาณสูง และมีกลิ่นหอม (ทวีศักดิ์ ชัยเรืองรอง, 2552) ปัจจุบันพุทราพันธุ์ซื่อมีปลูกมากในเขตภาคเหนือตอนบน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตจังหวัดเชียงราย (สำนักงานเกษตรจังหวัดเชียงราย, 2553)

มีรายงานการใช้พุทราจีนเป็นสมุนไพร และใช้เป็นส่วนผสมในยาสมุนไพรมาตั้งแต่สมัยโบราณ เนื่องจากพุทรามีสรรพคุณเป็นยาบำรุงเลือด บำรุงกำลังที่ดี (“สรรพคุณของพุทราจีน”, 2554) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพุทราสามารถลดคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด ป้องกันโรคความดันโลหิตสูง ป้องกันเส้นเลือดแข็งตัว ป้องกันเส้นเลือดหัวใจตีบ และป้องกันเส้นเลือดในสมองแตก อีกทั้งยังเป็นยาบำรุงประสาท รักษาโรคนอนไม่หลับ (Williams et al., 2006) ในประเทศไทยส่วนใหญ่ นิยมบริโภคพุทราในรูปผลสด โดยพบการบริโภคพุทรา ในรูปของผลแห้ง และใช้เป็นวัตถุดิบ และส่วนผสมในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ หลายชนิด เช่น พุทราเชื่อม พุทราดอง พุทราแผ่น และพุทราสามรส เป็นต้น (San & Yildirim, 2010)

การที่พุทรามีสมบัติการเป็นยาดังกล่าว อาจเนื่องจากพุทรามีองค์ประกอบที่สามารถต้านออกซิเดชัน และต้านจุลินทรีย์ได้ สารประกอบหลักในพุทราที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และวิตามินซี โดยสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในพุทราจีน ได้แก่ รูทีน (rutin) คาเทชิน (catechin) กรดโพรโตคาเทชอิก (protocatechuic acid) กรดแกลลิก (gallic acid) กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) และเควอซีทิน (quercetin) (San & Yildirim, 2010; Zhang, Jiang, Ye, S., Ye, Y. & Ren, 2010) นอกจากนี้ ยังพบว่าพุทรามีวิตามินเอ วิตามินซี วิตามินบี ฟอสฟอรัส และแคลเซียม อยู่ในปริมาณสูง (Agricultural Research Service United States Department of Agriculture, 2013) โดยพุทรามีวิตามินซีสูงถึง 69 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ซึ่งสูงกว่าผลไม้ที่ทราบกันดีว่ามีวิตามินซีสูง เช่น ส้ม มะนาว สตรอเบอร์รี่ และมะนาวไทย ตามลำดับ (National agricultural library, 2012)

อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของพุทราซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตร จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น พื้นที่ปลูก การดูแลต้นพุทราระหว่างการปลูก สภาพภูมิอากาศ สายพันธุ์ วิธีการสกัด เป็นต้น (Ohta & Kimura, 2007; Sun, Liang, Shan, Viernstein & Unger, 2011) โดยปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และการต้านจุลินทรีย์ ในพุทราพันธุ์ช่อมีที่ปลูกในเขตจังหวัดเชียงราย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ในพุทราได้หวัน สายพันธุ์ช่อมี เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาเรื่องอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี
- 1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี
- 1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างพุทราได้หวัน “พันธุ์ช่อมี่” ได้รับความอนุเคราะห์จากไร่บุญรอด ตำบลแม่กรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย โดยใช้ผลพุทราขนาดเล็ก ระดับรองจากเกรด C หรือทางไร่บุญรอดเรียกว่า “มุก” เปลือกมีสีเขียว หรือสีเหลืองบ้างเล็กน้อย มีผลสมบูรณ์ ปราศจากบาดแผล ตาหนิจากโรคและแมลง ที่เก็บเกี่ยวในปี พ.ศ. 2555

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วน คือ

1.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพุทรา ได้แก่ proximate analysis, ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรตได้ (titratable acidity, TA) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) และปริมาณวิตามินซี

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพุทรา ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย เวลาในการโซนิเคต (sonication time) และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

1.3.3 ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC), ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content, TFC) และปริมาณวิตามินซีของพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี่

1.3.4 ศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (วิธี DPPH และ FRAP) และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (วิธี disk diffusion และ broth microdilution) ของสารสกัดจากพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี่

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบองค์ประกอบทางเคมีของพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี่

1.4.2 ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี่

1.4.3 ทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพุทราได้หวันพันธุ์ช่อมี่

1.5 สมมติฐาน

- 1.5.1 พุทธาได้หวั่นพันธุ์ซื่อมี มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับพุทธาสายพันธุ์อื่น ๆ
- 1.5.2 สภาวะการสกัดมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพุทธา
- 1.5.3 พุทธาได้หวั่นพันธุ์ซื่อมี มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และมีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ที่สูงเช่นเดียวกับพุทธาพันธุ์อื่น ๆ



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

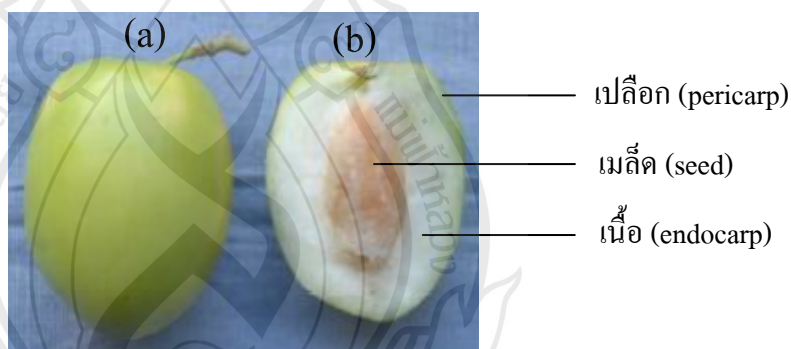
2.1 ถิ่นกำเนิดของพุทรา

พุทรา (*Jujube* spp.) อยู่ในวงศ์ Rhamnaceae โดยพุทราที่ปลูกแพร่หลายทั่วโลกมี 2 สายพันธุ์หลัก ๆ คือ พุทรานินเดีย (*Ziziphus mauritiana* Lam.) และพุทราจีน (*Z. jujuba* Mill.) (Williams et al., 2006; Ahmad, Khan, Bashir, Azam & Hussain, 2011) พุทรานินเดียมีถิ่นกำเนิดที่ประเทศอินเดียก่อนพุทธกาล ประมาณ 4,000 ปีที่ผ่านมา และแพร่หลายไปยังประเทศพม่า จากนั้นมีการค้าไปยังแถบแอฟริกา ประเทศจีน อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย ในช่วงปลายศตวรรษที่ 19 (Williams et al., 2006)

พุทราจีนเป็นพืชประจำถิ่นของภูมิภาคเขตอบอุ่นของเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเทศจีน และประเทศใกล้เคียง เช่น มองโกล และตอนกลางของทวีป พุทราจีนชอบเจริญในสภาพอากาศแห้ง และอบอุ่น แต่ชอบอากาศเย็นขณะพักตัว สามารถทนอุณหภูมิต่ำได้มากกว่าพุทรานินเดีย โดยสามารถมีชีวิตรอดได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง -10 องศาเซลเซียส การปลูกพุทราจีนได้แพร่หลายไปประเทศทางตะวันตก สู่ประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน จนถึงประเทศแถบเอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ เอเชียตะวันออกในประเทศเกาหลี และญี่ปุ่น ดังนั้นพุทราจีนและพุทรานินเดียจึงเป็นพืชพื้นเมืองในหลาย ๆ ประเทศในทวีปเอเชีย โดยปลูกมากในประเทศจีน อินเดีย เอเชียกลาง และเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ (Williams et al., 2006)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพุทรา

พุทราเป็นผลไม้เมืองร้อน เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ใบรูปทรงไข่ถึงกลมขนาดประมาณ 1 นิ้ว บริเวณลำต้นและกิ่งจะมีหนามแหลม ดอกจะออกเป็นช่อเล็ก ๆ สีเหลือง มีกลิ่นฉุน ดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ คือมีเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ผลพุทราเป็นผลประเภทเมล็ดเดี่ยวแข็ง (drupe) โดยผลหนึ่งมีเมล็ดเพียงหนึ่งเมล็ดที่มีเปลือกแข็งหุ้มเมล็ด ผลพุทรามีเปลือกสีเขียว รูปทรงมีทั้งที่เป็นแบบทรงกลมถึงรูปรี ปลายผลรูปร่างกลมถึงแหลม มีหลายขนาด ผลแก่จะมีสีเหลือง และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่จัด รสชาติมีทั้งแบบที่หวานสนิท เบี้ยวอมหวานหรือฝาด มีเมล็ดเดี่ยวอยู่กลางลูก ผลพุทรามีลักษณะสรีรวิทยาทางพฤกษศาสตร์แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยมีโครงสร้างทางสรีรวิทยาพื้นฐานของผลพุทรา ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ เมล็ด (seed) เนื้อ (endocarp) และเปลือก (pericarp) (ภาพที่ 2.1) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นพุทราอินเดีย และพันธุ์จีน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้



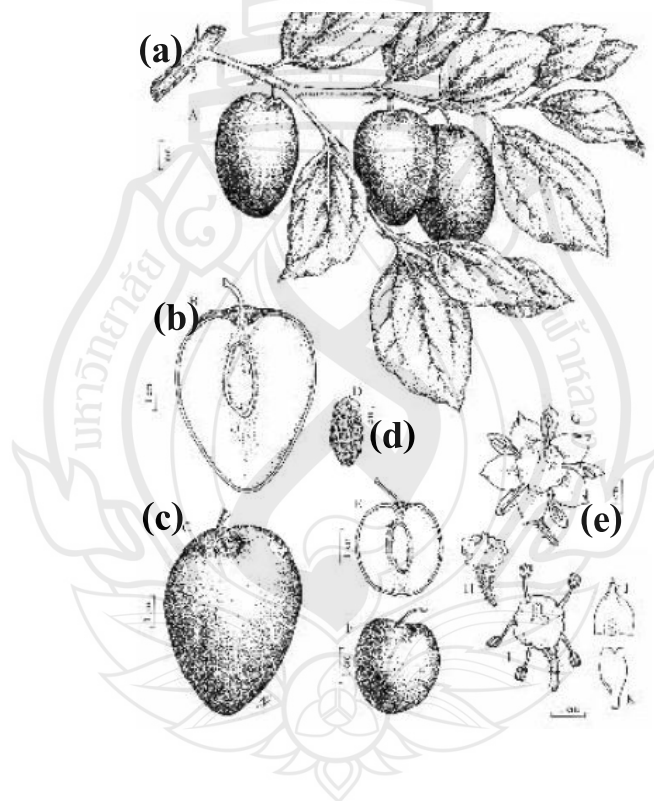
ที่มา Pareek (2013)

ภาพที่ 2.1 Physiology of Indian jujube (a) whole fruit (b) vertical section through a mature fruit

2.2.1 พุทราอินเดีย

พุทราอินเดีย มีชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Z. mauritiana* Lam. ลำต้นมีหนาม เป็นพุ่มขนาดเล็กถึงขนาดกลาง พุ่มมีลักษณะเป็นแบบตั้งตรง กิ่งตั้งตรง หรือแบบพุ่มกระจาย ลำต้นสูงตั้งแต่ 3-4 ถึง 10-14 เมตร หรืออาจสูงได้ถึง 20 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของพุ่มขนาด 0.4 เมตร พุทราอินเดียเป็นไม้กึ่งผลัดใบ มีกิ่งแขนงมาก เปลือกมีร่องลึกยาว สีเทา น้ำตาลเทา หรือแดงน้ำตาล มีกิ่งมีสีขาว และ

แน่นเมื่อต้นพุทรามีอายุน้อย มีกิ่งแบบตั้งตรง และแบบกระจาย ใบพุทราอินเดียมีรูปร่างรีเกือบกลม และมีสารเคลือบมัน ขาว และกว้างประมาณ 3-8 และ 1.50 – 5 เซนติเมตร ตามลำดับปลายและฐานใบมีลักษณะโค้งมนและสมมาตร ขอบใบมีหนาม และมีเส้นใบสามเส้นหลักจากฐานไปเกือบถึงปลายใบ ดอกพุทราอินเดียเป็นดอกที่มีกลีบเลี้ยงที่ปกคลุมไปด้วยขน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร และมีรังไข่ชนิดที่เป็นแบบสองเซลล์ (2-celled ovary) มีก้านเกสรตัวเมีย 2 ก้าน อยู่ติดกัน ขาวประมาณ 1 มิลลิเมตร มีกลิ่นฉุน ผลพุทราอินเดีย มีลักษณะหลากหลาย ตั้งแต่เป็นผลทรงกลม หรือผลทรงรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร หรือพุทรารูปไข่ บางสายพันธุ์อาจมีขนาดได้ถึง 5 x 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.2) โดยเนื้อผลมีรสเปรี้ยวอมหวาน มีสีเขียว เหลืองหรือสีแดง

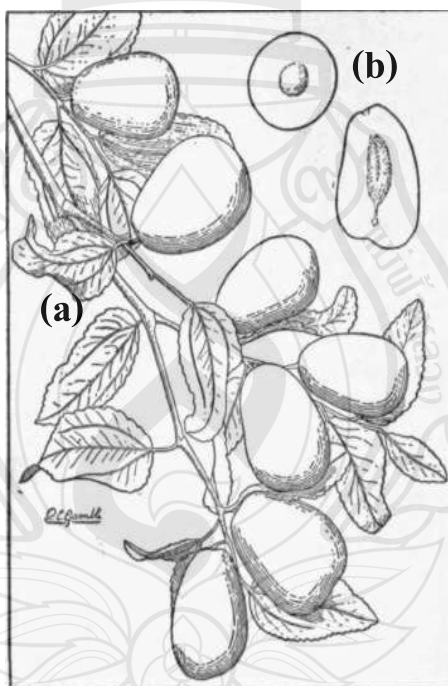


ที่มา Williams et al. (2006)

ภาพที่ 2.2 Indian jujube (a) jujube fruit on the tree (b) vertical section through a mature fruit (c) the whole fruit (d) seed (e) flower

2.2.2 พุทราจีน

พุทราจีน มีชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Z. jujuba* Mill. ต้นพุทราจีนเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก โดยอาจสูงถึง 8 - 10 เมตร มีกิ่งขนาดใหญ่เป็นแบบกระจาย และมีก้านแข็ง ลักษณะเป็นปุ่มปม รูปร่างต้นเป็นแบบแผ่กิ่งก้านเป็นร่มไม้ กิ่งมีหนามเป็นคู่ โดยหนามอันหนึ่งจะใหญ่ส่วนหนามอีกอันจะสั้นกว่าและม้วน กิ่งแขนงมีลักษณะคดไปมา โดยกิ่งที่ให้ผลจะมีการผลัดใบซึ่งต่างจากพุทราอินเดีย ใบของพุทราจีนยาวประมาณ 2.5 – 5 เซนติเมตร รูปร่างยาวรี ปลายทู่ มีเส้นใบ 3 เส้น มีก้านใบยาว 2.5 – 7.5 เซนติเมตร โดยใบเลี้ยงจะเกิดเป็นหนาม มีดอกเป็นกลุ่มดอกเป็นกระจุกอยู่ที่บริเวณง่ามดอกเป็นรอยหยัก มีก้านเกสรตัวเมีย 2 ก้านที่เชื่อมติดกันครึ่งหนึ่งของความยาวของก้านเกสรตัวเมีย ผลพุทราจีนมีลักษณะทรงไข่ ยาวประมาณ 1.5 - 2.3 เซนติเมตร สีน้ำตาลแดงจนถึงดำ มีก้านสั้น และข้อยลงมา เนื้อผลมีรสชาดเปรี้ยวอมหวาน (ภาพที่ 2.3)



ที่มา Popenoe (2011)

ภาพที่ 2.3 Chinese jujube (a) jujube fruit on the tree (b) vertical section through a mature fruit

2.3 พันธุ์พุทราที่ปลูกในประเทศไทย

ประเทศไทยสามารถปลูกพุทราได้หลายสายพันธุ์ในทั่วทุกภาคของประเทศ แหล่งปลูกพุทราที่สำคัญของไทย ได้แก่ จังหวัดระยอง สมุทรสงคราม ลพบุรี อโยธยา และสมุทรปราการ ตามลำดับ โดยพุทราแต่ละพันธุ์จะมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน ได้แก่ สีเปลือก ขนาด และรูปร่างของผล และลักษณะดังกล่าวจะแตกต่างกันไปเมื่อปลูกในพื้นที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศและสภาพภูมิประเทศ โดยสรีรวิทยาของพุทราแต่ละสายพันธุ์ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (นิตดา หงส์วิวัฒน์ และทวีทอง หงส์วิวัฒน์, 2552)

2.3.1 พุทราพันธุ์พื้นเมือง หรือพุทราป่า

เป็นพันธุ์ที่ปลูกกันมากที่สุด ได้แก่ พันธุ์ลูกเกดและพันธุ์ไข่เต่า ส่วนของใบมีขนาดเล็ก ผลของพุทราพื้นเมืองมีลักษณะเป็นกลมป้อม ผลทรงรีเหมือนไข่เต่า หรือกลมแป้น สีเขียวอมเหลือง เปลือกบาง และค่อนข้างใส เนื้อในสีเหลือง เนื้อหยาบ รสเปรี้ยว และฝาดอมหวาน เมล็ดขนาดเล็ก กลมหรืออยู่ติดชั่วผล

2.3.2 พุทราพันธุ์เจดีย์

เป็นต้นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ประเภทผลัดใบ มีความสูงโดยเฉลี่ย 1.50 - 2 เมตร กิ่งก้านแตกไม่เป็นระเบียบ เปลือกลำต้นมีสีเทาปนน้ำตาล เป็นไม้เนื้ออ่อน กิ่งมี หนามแหลมปกคลุม เป็นพันธุ์ไม้ชนิดใบเดี่ยวปลายใบแหลม กว้างประมาณ 1 - 1.50 นิ้ว ขอบใบมีรอยหยักตลอดใบ เส้นใบเรียงตัวเป็นสามแฉกอย่างชัดเจน พุทราเจดีย์มีอยู่ 2 พันธุ์ คือพันธุ์สีเหลือง หรือพุทราเจดีย์ พันธุ์เหลืองทอง ลักษณะผลจะมีสีเหลือง กิ่งเหลืองจำปา ลูกมีลักษณะกลมแป้น รสชาติจะออกเปรี้ยวมากกว่าหวาน และพันธุ์สีเขียว เรียกว่า พุทราเจดีย์สีเขียว ผลมีสีเขียวอมเหลือง ขนาดผลเล็กกว่าพันธุ์เจดีย์เหลืองทอง แต่รสชาติจะออกหวานมากกว่าเปรี้ยว

2.3.3 พุทราพันธุ์บอมเบย์

เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากคอลกาตา (Kolkata) ประเทศอินเดีย ใบมีลักษณะยาวรี ปลายใบแหลมงอเล็กน้อย ผลมีขนาดใหญ่ ทรงยาวรี ขั้วผลนูนเล็กน้อย มีสีเหลืองอ่อน เปลือกบางเป็นมัน เนื้อสีทอง ละเอียด รสหวาน เนื้อกรอบมาก เมล็ดใหญ่ยาวรี

2.3.4 พุทธพันธุ์เหริยทอง

เป็นพันธุ์ที่มีใบใหญ่ยาวรี สีเขียวเข้ม ผลมีขนาดใหญ่ ทรงกลมคล้ายแอปเปิล ตรงขั้วและก้นบวมเล็กน้อย มีสีเขียวเข้ม เปลือกหนา ผิวหยาบ ไม้โต เนื้อสีขาว ละเอียด รสหวาน มีกลิ่นหอม เนื้อกรอบกว่าพุทธพันธุ์อื่น เมล็ดใหญ่ยาวรี

2.3.5 พุทธพันธุ์แอปเปิล

เป็นพันธุ์ที่มีใบขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายรูปหัวใจ สีเขียวเข้ม ออกดอกเป็นพวง ผลมีขนาดใหญ่ กลมแป้น ขั้วและก้นบวมมาก เปลือกหนาใส มีสีเขียวเข้ม เนื้อสีขาวกรอบ ละเอียด รสหวาน อมเปรี้ยว

2.3.6 พุทธพันธุ์สาละ หรือพันธุ์บอมเบย์ยักษ์ หรือพันธุ์โกลเด้น

พุทธพันธุ์สาละ มีใบขนาดใหญ่ ผลคล้ายผลสาละ มีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์อื่น ๆ ตรงกันจะมีขนาดใหญ่กว่าขั้วผล ขั้วและก้นบวม ผิวสีเหลือง และมีริ้วสีน้ำตาลเป็นทางยาวพาดจากขั้วผลไปยังท้ายผล เปลือกบางใส เมล็ดมีขนาดใหญ่ ยาวรี เนื้อสีทอง ค่อนข้างหยาบ รสหวานกรอบ เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อมากที่สุด

2.3.7 พุทธพันธุ์จีน

มีผิวสีน้ำตาลแดง เนื้อสีขาวอมเขียว เนื้อกรอบรสหวานจัด แต่เมืองไทยนำเข้าเฉพาะพุทธาจีนแห้ง ผิวสีแดงอมส้ม นำมาทำเป็นพุทธาเชื่อม ใช้ใส่ขนมหวานอย่างจีนได้หลายชนิด เช่น พุทธาทอด สามแซ่ และเต้าทึง เป็นต้น

2.3.8 พุทธพันธุ์ไต้หวัน

พุทธพันธุ์ไต้หวันมีลักษณะเด่นคือลำต้นไม่มีหนาม ทำให้สะดวกในการเก็บผลผลิต พุทธาไต้หวันที่นิยมปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยมี 3 สายพันธุ์ (ทวีศักดิ์ ชัยเรืองรอง, 2552) คือ

2.3.8.1 พุทธพันธุ์มั่งเภา

พุทธพันธุ์มั่งเภา แปลเป็นภาษาไทยเรียกว่าพันธุ์ “พุทธาน้ำผึ้ง” เป็นสายพันธุ์ที่มีการปลูกมากที่สุดในไต้หวัน ด้วยคุณภาพที่เนื้อหวานและกรอบ มีรูปทรงเป็นรูปกระสวย ขนาดของผลใหญ่ มีน้ำหนักผลเฉลี่ย 5-6 ผลต่อกิโลกรัม

2.3.8.2 พุทราพันธุ์สามรส

พุทราพันธุ์สามรสมีใบขนาดเล็กยาวรี สีเขียวเข้ม แผ่นใบหนา ผลทรงกลมแป้น ที่ขั้วและก้นบวม ผลมีสีเขียว สีเขียวอมเหลือง สีเหลืองปนแดง เปลือกบางใส เนื้อละเอียดสีขาวกรอบ รสเปรี้ยวอมหวานและฝาด เมล็ดเล็กกลมอยู่ติดขั้วผล

2.3.8.3 พุทราพันธุ์ซื่อมี

พุทราพันธุ์ซื่อมีเป็นพันธุ์ใหม่และเป็นที่นิยม นำเข้าจากประเทศไต้หวันได้ประมาณ 9 ปี นับจากปี 2548 เนื้อกรอบ รสหวาน มีขนาดของผลใหญ่และมีน้ำหนักมาก เป็นพุทราที่มีรูปทรงของผลเป็นทรงกระบอกหรือทรงยาว ขนาดของผลเมื่อใหญ่เต็มที่จะมีน้ำหนัก 6 - 8 ผลต่อกิโลกรัม เนื้อกรอบ รสหวาน ไม่ฝาด มีปริมาณใยอาหาร (fiber) สูง และมีกลิ่นหอม มีปลูกมากในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนบน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่จังหวัดเชียงราย พุทราพันธุ์ซื่อมีให้ผลแก่เก็บเกี่ยวได้ในช่วงเดือนตุลาคมถึงมกราคม

จังหวัดเชียงราย เป็นแหล่งปลูกพุทราไต้หวันมากที่สุดในประเทศไทย โดยอำเภอแม่ลาว มีพื้นที่ปลูกรวมมากที่สุด รองลงมาคือ อำเภอเมือง และอำเภอเวียงป่าเป้า ซึ่งมีพื้นที่ปลูกรวม 55, 50 และ 10 ไร่ ตามลำดับ นอกจากนั้นอำเภอแม่ลาวยังมีผลผลิตรวมมากที่สุด รองลงมาคือ อำเภอเวียงป่าเป้า และอำเภอเมือง โดยให้ผลผลิตรวม 220, 50 และ 20 ตันต่อปี ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 Cultivation area of Taiwanese jujube in Chiang Rai Province

Amphur	Yield area (Rai)	Plant area (Rai)	Yield per rai (kg)	Total yield (ton/ year)
Mae Lao	55	55	4,000	220
Wiang Pa Pao	10	10	2,000	20
Muang	-	50	-	50
รวม	65	115	6,000	290

ที่มา Chiang Rai Provincial agriculture extension office (2010)

2.4 องค์ประกอบทางเคมีของพุทรา

จากรายงานของ National Agricultural Library (2012) กล่าวว่า พุทรายเป็นแหล่งของสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยพบว่า พุทรายเป็นผลไม้ที่ให้พลังงานสูงที่สุดคือ 79 กิโลแคลอรี (Kcal) ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด รองลงมาคือ สตรอเบอร์รี่ แอปเปิ้ล ส้ม มะนาวไทย และมะนาวฝรั่ง ตามลำดับ นอกจากนี้พุทรายังมีโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตสูงเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ชนิดอื่น ๆ และพุทรายังเป็นแหล่งของวิตามินซี โดยพบว่าพุทรามีวิตามินซีสูงถึง 69 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ซึ่งสูงกว่าวิตามินซีที่พบในผลบางชนิดที่เป็นที่รู้จักกันดีว่า มีปริมาณวิตามินซีสูง ได้แก่ ส้ม มะนาว สตรอเบอร์รี่ และมะนาวไทย เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าพุทราเป็นแหล่งของแคลเซียม และแร่ธาตุอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น โพแทสเซียมอีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 Chemical composition and energy content of jujube and other fruits

Composition	Unit	Content per 100 g wet weight					
		Jujube	Orange	Strawberry	Lemon	Lime	Apple
Moisture	g	77.86	88.30	80.66	92.31	88.26	85.56
Protein	g	1.20	0.70	0.58	0.35	0.70	0.26
Lipid	g	0.20	0.20	6.00	0.24	0.20	0.17
Carbohydrate	g	20.23	10.40	17.36	6.90	10.54	13.81
Calcium	mg	21.00	11.00	21.00	6.00	33.00	6.00
Potassium	mg	250.00	200.00	292.00	103.00	102.00	107.00
Vitamin C	mg	69.00	50.00	37.00	39.00	29.00	5.00
Energy	kcal	79.00	45.00	69.00	22.00	30.00	52.00

ที่มา National Agricultural Library (2012)

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีของพุทราแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ พื้นที่เพาะปลูก สภาพแวดล้อมการปลูก ฤดูกาลในการเก็บเกี่ยว เป็นต้น เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น ๆ (Li, Fan, Ding, S. & Ding, X., 2007; Ohta & Kimura, 2007; Sun et al., 2011) ตามรายงานของ Li et al. (2007) ที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพุทราจีน 5 สายพันธุ์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันไป โดยแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 Chemical composition of different cultivars of dried Chinese jujube

Composition	Cultivars				
	Jinsixiaozao	Yazao	Jianzao	Junzao	Sanbianhong
Moisture (%)	18.99	20.98	17.38	21.09	22.52
Carbohydrate (%) DW	81.62	80.86	84.85	82.17	85.63
Reducing sugar (%) DW	57.61	60.24	77.93	58.73	67.32
Protein (%) DW	5.01	6.86	4.75	6.43	6.60
Ash (%) DW	2.26	2.78	2.41	3.01	2.56
Vitamin C (mg/100 g) DW	359.00	192.00	203.00	296.00	315.00

หมายเหตุ: DW: Dry weight

ที่มา Li et al. (2007)

จากตารางที่ 2.3 พบว่าพุทราจีนแห้ง แต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยพบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต น้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีน และเถ้า อยู่ในช่วงร้อยละ 81-85, 60-70, 5-7, และ 2-3 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เช่นเดียวกับปริมาณวิตามินซีในพุทราแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณแตกต่างกัน โดยอยู่ในช่วงตั้งแต่ 192-359 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และมีค่าสูงกว่าปริมาณวิตามินซีที่องค์การอนามัยโลก (FAO) และองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (WHO) แนะนำให้ควรได้รับต่อวัน (45 มิลลิกรัมต่อวัน) ประมาณ 8 เท่า

(FAO & WHO, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณวิตามินซีในพุทราจีนมีมากกว่าปริมาณวิตามินซีที่พบในพุทราอินเดีย 3 เท่า (William et al., 2006)

2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพุทรา

มีรายงานการใช้พุทราเป็นยาสมุนไพร หรือเป็นส่วนผสมในยาสมุนไพรมาตั้งแต่สมัยโบราณ เนื่องจากพุทรามีสรรพคุณเป็นยาบำรุงเลือด บำรุงกำลังที่ดี (“สรรพคุณของพุทราจีน”, 2554) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพุทราสามารถลดคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด รักษาโรคนอนไม่หลับ ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ป้องกันโรคความดันโลหิตสูง ป้องกันเส้นเลือดแข็งตัว ป้องกันเส้นเลือดหัวใจตีบตัน และป้องกันเส้นเลือดในสมองแตก อีกทั้งยังเป็นยาบำรุงประสาทได้ (Williams et al., 2006; Naili, Alghazeer, Saleh, & Al-Najjar, 2010; Liang & Juan, 2011) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพุทรา ส่งผลให้เกิดฤทธิ์การต้านออกซิเดชันทำให้สามารถรักษาและป้องกันโรคดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพุทรามีฤทธิ์ในด้านจุลินทรีย์อีกด้วย โดย Leal et al. (2010) รายงานว่าสารไตรเทอร์พีน (triterpene) เป็นสารออกฤทธิ์ในพุทราที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย สกุล *Staphylococci* ได้ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพุทรา ได้แก่ ผลพุทรา ใบพุทรา หรือ เมล็ดพุทรา มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์แตกต่างกันไป และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. pumalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescense*, *Salmonella typhi*, *Xanthomonas axonopodias*, *Proteus vulgaris* และเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Dreschlera turcica*, *Fusarium verticillioides* เป็นต้น (Mahesh & Satish, 2008; Abalaka, Daniyan & Mann, 2010; Naili et al., 2010, Ahmad et al., 2011)

โดยงานวิจัยดังกล่าว รายงานผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัดจากพุทราสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสมบัติของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดที่ได้จากพุทราต่างสายพันธุ์กัน หรือสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน จะให้ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ต่างกันด้วย (Abalaka et al., 2010; Naili et al., 2010)

2.5.1 ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืชหลัก ๆ ที่พบในพุทรา ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) หรือโพลีฟีนอล (polyphenol) ซึ่งประกอบไปด้วยกรดฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (ตารางที่ 2.4) (San & Yildirim, 2010; Wang et al., 2011) โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพุทรา แสดงดังตาราง 2.4

ตารางที่ 2.4 Phenolic compounds in jujube

Main class	Sub-Class	Name
Phenolic acids	Hydroxycinnamic acids	<i>p</i> -coumaric acid
		Cinnamic acid
		Caffeic acid
		Chlorogenic acid
		Ferulic acid
	Hydroxybenzoic acids	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
		Protocatechuic acid
		Gallic acid
		Vanillic acid
		Quercetin
Flavonoids	Flavonols	Rutin
		Quercetin-3-galactoside
		Quercetin-3-rutinoside
	Flavanols	Kaempferol-glucosyl-rhamnoside
		Quercetin-3-robinobioside
		Epicatechin
		Catechin

ที่มา Gao, Wu & Wang (2013)

จากตารางที่ 2.4 จะเห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกหลัก ๆ ที่พบในพุทรา ในกลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acids) เช่น กรดคูมาริก (*p*-coumaric acid) กรดซินนามิก (cinnamic acid) กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-hydroxybenzoic acid) กรดโปรโตคาเทอชอิก (protocatechuic acid) กรดแกลลิก (gallic acid) และกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น เควอซีทิน (quercetin) รุทีน (rutin) อีพิกาทะชิน (epicatechin) คาเทชิน (catechin)

2.5.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัด

ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชมีหลายประการ เช่น สายพันธุ์ ระยะการเจริญเติบโต แหล่งเพาะปลูก สภาพแวดล้อม และสภาวะต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ เช่น วิธีการสกัด ชนิดตัวของท่าละลาย อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อตัวทำละลาย เวลาในการโชนิก (Li, Ding, S. & Ding, X., 2005; San & Yidirim, 2010; Sun et al., 2011; Wang, Q., Liu, Du, Cui, Chen & Liu, 2011; Zhang et al., 2010) นอกจากนี้ส่วนของผลไม้ที่ต่างกัน จะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันด้วยเช่นกัน โดยมีรายงานว่า เปลือกพุทราปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และวิตามินซีมากกว่าในเนื้อผลพุทรา (Xue, Feng, Cao, Cao & Jiang, 2009; Zhang et al., 2010) เช่นเดียวกับที่มีรายงานในพืชและผลไม้ชนิดอื่น ๆ (Wolfe, Wu & Liu, 2003; Contreras-Calderon, Calderon-Jaimes, Guerra-Hernandez & Garcia-Villanova, 2011; Moraes-Barros, Castro-Ferreira & Genovese, 2012) ซึ่งอาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์ดังกล่าวในพืชสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันพืช และเปลือกผลไม้เป็นเนื้อเยื่อที่ป้องกันเนื้อผลจากการถูกทำลายจากภายนอกเป็นลำดับแรก (วรพล เองวานิช, 2555)

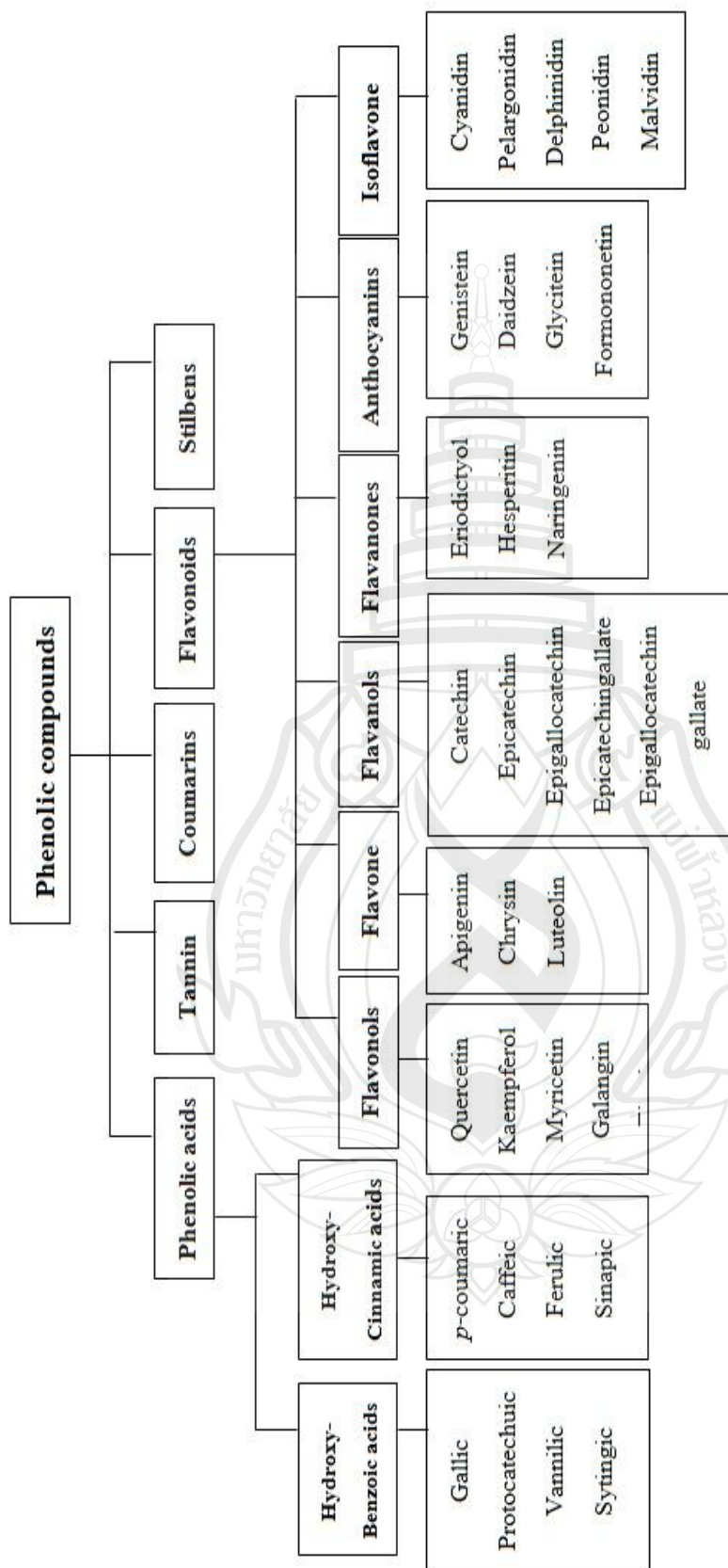
นอกจากนี้ยังพบว่า ความสมบูรณ์ของผล และความอ่อนแก่ของผลพุทราส่งผลต่อปริมาณวิตามินซีในผลพุทรา โดยพบว่าวิตามินซีในผลพุทราจะลดลงเมื่อผลสุก และมีปริมาณลดลงอีกในระหว่างการเก็บรักษา (Al-Mohizea, El-Behery & Hablass, 1986) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนต่าง ๆ ของพุทราจะแตกต่างกันไป เช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบมากในใบพุทรา คือ รุทีน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเนื้อผลพุทรา คือ เควอซีทิน แคมเฟอร์อล (kaempferol) และคาเทชิน (Pawlowska, Camangi, Bader & Braca, 2009; San & Yildirim, 2010; Taati, Allirezaei, Moshkatsadat, Rasouljan, Moghadasi, Sheikhzadeh & Sokhtezari, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เมื่อใช้เอทานอลหรือเมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด จะสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ได้มากกว่าเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัด (Wang, W., Wu, Han, Zhang, Sun & Dong, 2011; Kim & Son, 2011)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลให้มากขึ้นอย่างต่อเนื่องจะทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นแต่อย่างไรก็ตาม หากเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลสูงจนเข้าใกล้เอทานอลบริสุทธิ์ (pure ethanol) จะทำให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ลดลงตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนของกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของฟีนอล หรือสารประกอบฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีน้ำตาลในโมเลกุล เป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) คือ เป็นส่วนที่ชอบน้ำ จึงทำให้ละลายในตัวทำละลายที่มีน้ำและเอทานอลได้ดีกว่าเอทานอลบริสุทธิ์ (Chew et al., 2011; Wang, W. et al., 2011; Radojkovica, Zekovica, Jokicb & Vidovica, 2012)

มีรายงานว่า การโซนิเคตมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดเช่นเดียวกับความเข้มข้นของตัวทำละลาย คือ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการโซนิเคตเพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่ง และเมื่อเพิ่มเวลาในการโซนิเคตมากขึ้นปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจะมีปริมาณลดลง (Wang, W. et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Annegowda, Bhat & Tze (2011) โดยทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการโซนิเคตทำให้เกิดการสั่นสะเทือนจากเสียง (acoustic cavitation) ทำให้เซลล์พืชแตกและตัวทำละลายสามารถเข้าไปในเซลล์พืชและสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวได้มากขึ้น แต่เมื่อเวลาในการโซนิเคตเพิ่มขึ้น สารที่ไม่ละลายน้ำ หรือไขมันที่แขวนลอยในเซลล์จะไปจำกัดการซึมผ่านของตัวทำละลายให้ช้าลง และขณะเดียวกันสารถูกละลาย (solute) จะดูดซึมกลับบนอนุภาคของพืชที่แตก ทำให้สารประกอบที่สกัดได้มีปริมาณน้อยลง (Wang, W. et al., 2011)

2.5.3 กลไกการออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

กลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ โครงสร้างทางเคมี ความสามารถในการแทรกสอดเข้าไปในเซลล์พืช โครงสร้างหมู่ฟังก์ชันของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น ๆ (Ross & Kasum, 2002; Soobrattee, Neergheen, Luximon-Rammaa, Aruomab & Bahorun, 2005) จากที่กล่าวมาข้างต้นว่า สารประกอบหลัก ๆ ในพืชที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และวิตามินซี โดยสารประกอบฟีนอลิกมีหลายประเภทดังแสดงในภาพที่ 2.4 ซึ่งมักพบในพืชชนิดอื่น ๆ เช่นกัน (ตารางที่ 2.5) ซึ่งมีกลไกการต้านออกซิเดชันดังนี้ คือ



ที่มา Liu (2004)

ภาพที่ 2.4 Classification of phenolic compounds

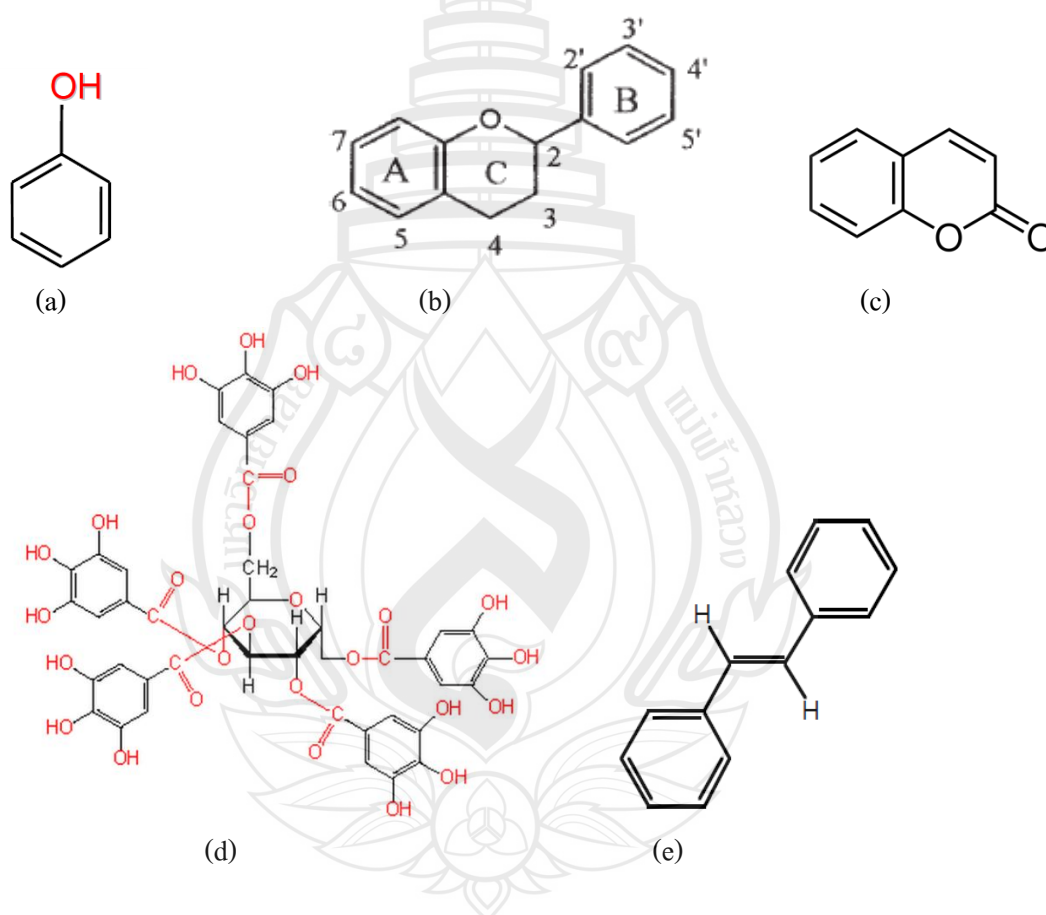
ตารางที่ 2.5 Source of phenolic compounds in plants

Phenolic compounds	Subclass	Plants
Phenolic acids	Hydroxycinnamic acids	Apricots, blueberries, carrots, cereals, pears, cherries, citrus fruits, oilseeds, peaches, plums, spinach, tomatoes, eggplants
	Hydroxybenzoic acids	Blueberries, cereals, cranberries, oilseeds
Flavonoids	Flavanols	Apples, beans, blueberries, buckwheat, cranberries, endive, leeks, lettuce, onions, olive, pepper, tomatoesacid
	Flavone	Citrus fruits, celery, parsley, spinach
	Flavanols	Apples, blueberries, grapes, onions, lettuce
	Flavanones	Citrus fruits
	Anthocyanins	Bilberries, black and red currants, blueberries, cherries, chokecherries, grapes, strawberries
	Isoflavone	Soybeans
Tannin	Condensed	Apples, grapes, peaches, plums, mangosteens, Pears
	Hydrolyzable	Pomegranate, raspberries
Coumarins	-	Carrots, celery, citrus fruits, parsley, parsnips
Stilbenes	-	Grapes

ที่มา Naczk and Shahidi (2006)

2.5.3.1 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกมีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) โดยจับอยู่กับโครงสร้างวงแหวน (aromatic ring) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดหลัก ๆ คือ ฟีนอลอย่างง่าย (simple phenol) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเพียงหมู่เดียว (ภาพที่ 2.5 (a)) และโพลีฟีนอล (polyphenol) ที่ประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิลหลายหมู่ ซึ่งจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับจำนวนของหมู่ฟังก์ชันฟีนอลในโมเลกุลนั้น ๆ และการจัดเรียงตัวของโครงสร้าง (วรพล เองวานิช, 2555; Lui, 2004) ภาพที่ 2.5 แสดงโครงสร้างอย่างง่ายของฟีนอลและโพลีฟีนอล

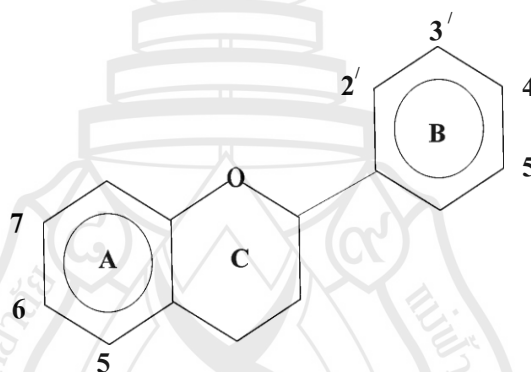


ที่มา Lui (2004), Sengbusch (2003), Friedli (2013)

ภาพที่ 2.5 Basic structure of phenol and polyphenol (a) phenol, (b) flavonoid (c) coumarin
(d) tannin (e) stilben

โดยสารในกลุ่มนี้สามารถจับกับอออนของโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ทำให้ อออนของโลหะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไป โดยความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ของสารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลและการจัดเรียงตัวของโครงสร้าง โดยสามารถจับกับอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิลและเปอร์ออกไซด์ (วรพล เองวานิช, 2555)

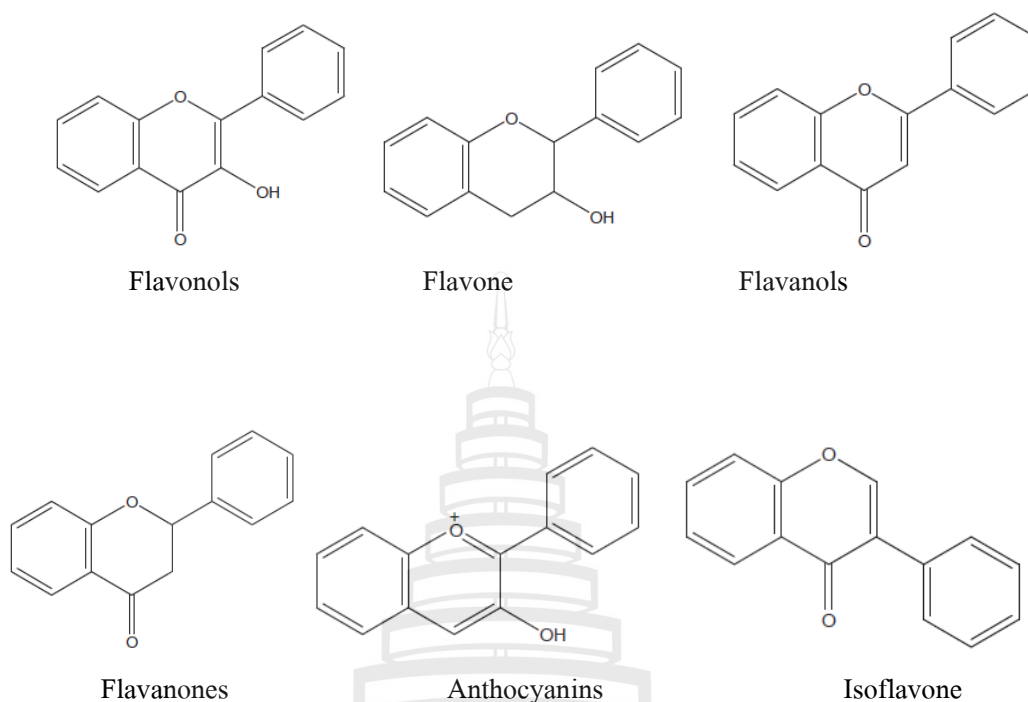
ส่วนสารฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกอีกชนิดหนึ่งที่พบในพืชราก โดยสามารถพบในพืชชนิดอื่น ๆ เช่นกัน (ตารางที่ 2.5) โครงสร้างทั่วไปของฟลาโวนอยด์เป็นไดฟีนิล โพรเพน (diphenylpropanes) ($C_6-C_3-C_6$) ประกอบด้วยโครงสร้างวงแหวนที่มีธาตุคาร์บอนจำนวน 15 ตัว เรียงตัวกันในรูปวงแหวนเบนซีนจำนวน 2 วงเชื่อมต่อกัน ดังภาพที่ 2.6



ที่มา Ross and Kasum (2002)

ภาพที่ 2.6 Basic structure of flavonoid

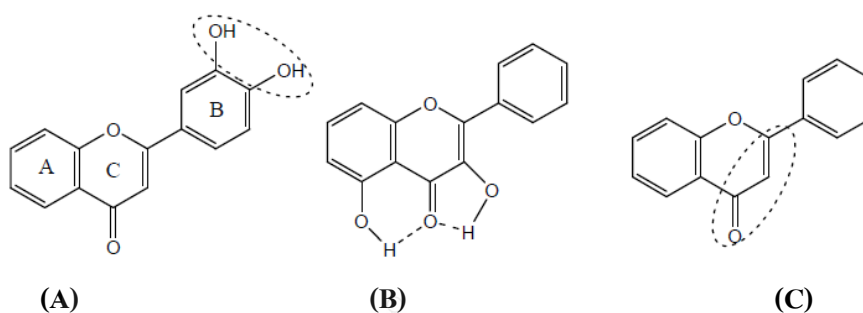
โดยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ตามความแตกต่างของโครงสร้างวงแหวน C (heterocyclic C-ring) ได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาวาโนน (flavanones) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) และ ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงในภาพที่ 2.7



ที่มา Huang and Cai (2010)

ภาพที่ 2.7 Chemical structure of flavonols, flavone, flavanols, flavanones, anthocyanins and Isoflavone

ทั้งนี้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์ในแต่ละกลุ่มจะมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความยากง่ายในการปลดปล่อยไฮโดรเจนอะตอมจากกลุ่มไฮดรอกซิลที่อยู่บนโครงสร้างวงแหวนให้แก่อนุมูลอิสระ และความสามารถของสารโครงสร้างวงแหวนในการให้อิเล็กตรอนไร้คู่ (unpaired electron) อันเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของอิเล็กตรอน (electron delocalization) และกลุ่ม 4'-OH และ 3'-OH ในโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ โดยมีรายงานว่า การเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งอโธ (Ortho) ของคาร์บอนตัวที่ 4 (C-4) จะทำให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฟลาโวนอลที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลระหว่าง 5 - 8 หมู่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงกว่ากลุ่มย่อยไอโซฟลาโวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลบนวงแหวนระหว่าง 1 - 3 หมู่ (วรพล เองวานิช, 2555) โดยตำแหน่งสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์ แสดงในภาพที่ 2.8



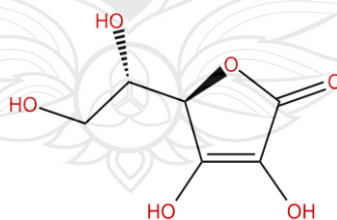
หมายเหตุ. (A) *o*-diphenolic group (in ring B), (B) 2–3 double bond conjugated with 4-oxo function and (C) hydroxyl groups in positions 3 and 5

ที่มา Soobrattee et al. (2005)

ภาพที่ 2.8 Structural groups for radical scavenging of flavonoids

2.5.3.2 วิตามินซี

วิตามินซีเป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.6 ซึ่งเป็นสารประกอบแลกโตนที่มีคาร์บอน 6 อะตอม สังเคราะห์มาจากสารตั้งต้นคือ GDP-mannose จากโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิลด้วยกัน 4 หมู่ จึงทำให้วิตามินซีมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี และเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ออกฤทธิ์ในส่วนที่เป็นของเหลวระหว่างเซลล์ (intercellular fluid) และภายในเซลล์ (cytosol) ได้ (วรพล เองวานิช, 2555)



ที่มา National Institute of Standards and Technology (2012)

ภาพที่ 2.9 Chemical structure of vitamin C

ตารางที่ 2.6 Source of vitamin C

Vegetables	fruits	Meat and Alternatives
Red yellow & green peppers	Guava	Chestnuts (Japanese, Chinese)
Broccoli	Papaya	Liver (pork, chicken, turkey),
Red cabbage	Kiwifruit	cooked Clams, cooked
Cauliflower	Orange	
Kale	Lychee	
Balsam pear	Berries	
Potato with skin	Pineapple	
Bok choy	Grapefruit	
Asparagus	Cantaloupe	
Snow peas	mango	
	Avocado	

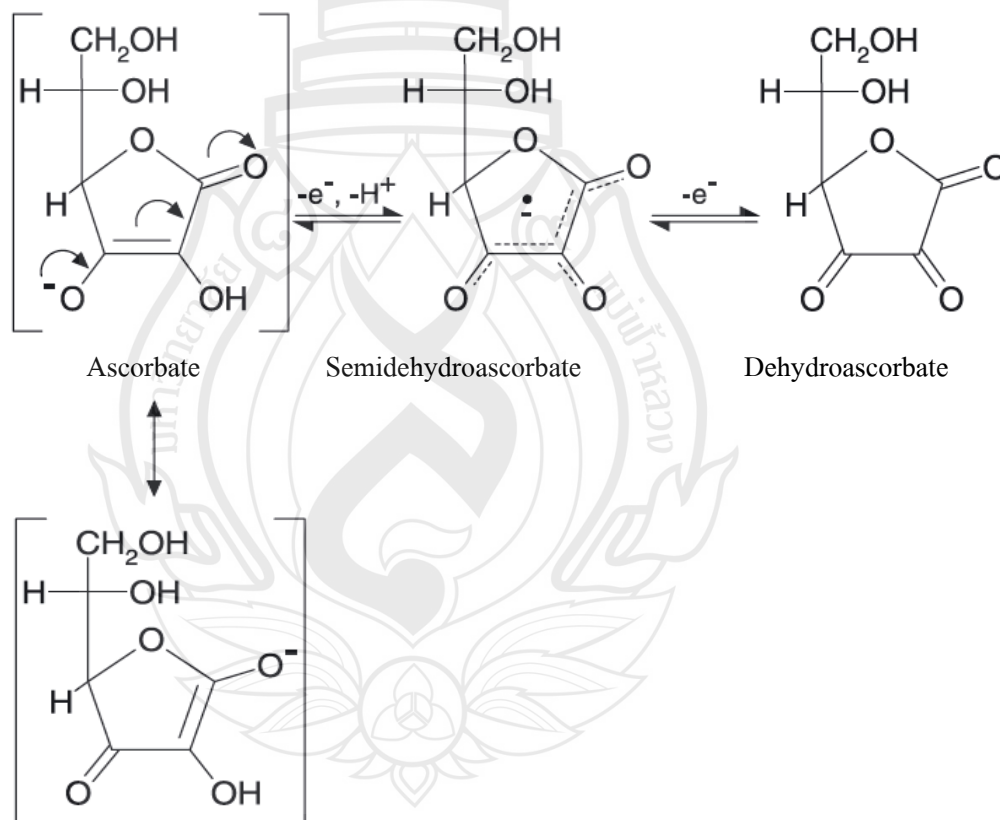
ที่มา Canadian Nutrient File (2010)

วิตามินซีอยู่ในรูปของกรดแอสคอร์บิกหรือแอสคอร์เบต เป็นตัวรีดิวซ์ที่ไม่เสถียร โดยทำหน้าที่ตัวให้อิเล็กตรอนกับสารอื่น ซึ่งการเสื่อมสลายแอสคอร์บิกเมื่อสัมผัสกับอากาศ เป็นออกซิเจนให้เป็นน้ำ ปฏิกิริยารีดอกซ์จะเร่งโดยการมีไอออนโลหะและแสง ที่สามารถออกซิไดส์สารดังกล่าวโดยให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ หรือถ้าออกซิไดส์ต่อเนื่องเป็นทวีคูณจะเกิดสารที่ความเสถียร เรียกว่า ดีไฮโดรกรดแอสคอร์เบต (Dehydroascorbate; DHA) โดยมีสูตรทางเคมีเป็น $C_6H_4O_6$ โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยา แสดงดังสมการที่ 2.1



อนุมูลอิสระ กรดแอสคอร์เบต สารที่เสถียร ดีไฮโดรกรดแอสคอร์เบต

โดยกรดแอสคอร์เบตจะทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิแดนซ์ โดยปกติจะทำปฏิกิริยากับออกซิแดนซ์ของรีแอคทีฟออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งเกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้พืชหรือสัตว์เกิดการเสียหายในระดับโมเลกุล เนื่องจากทำปฏิกิริยากับ กรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมัน บางครั้งอนุมูลอิสระเหล่านี้ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของปฏิกิริยาถูกใช้ กรดแอสคอร์บิกจะสามารถหยุดปฏิกิริยาถูกใช้ โดยการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระ ความพิเศษของกรดแอสคอร์บิก คือกรดแอสคอร์บิกสามารถให้อิเล็กตรอนเดี่ยว (single electron) เนื่องจากความเสถียรของไอออนอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกเอง เรียกว่า เซมิดีไฮโดรแอสคอร์เบต (semidehydroascorbate; SDA) และ ดีไฮโดร-กรดแอสคอร์เบต โดยกลไกการต้านออกซิเดชันของวิตามินซีแสดงในภาพที่ 2.10



ที่มา Linster and Schaftingen (2006)

ภาพที่ 2.10 Antioxidant of mechanism vitamin C

2.5.4 กลไกการออกฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยกลไกการออกฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์นั้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยสามารถแบ่งกลุ่มหลัก ๆ ได้ดังนี้ (“กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์การยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์”, 2013)

2.5.4.1 การทำลายที่ผนังเซลล์ หรือการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

พบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ที่พบในน้ำตา ใตเลือดขาว เมือก เป็นต้น และยังพบในแบคทีเรียอีกหลายชนิด เอนไซม์นี้จะไปย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตก สารเคมีบางชนิดอาจไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโต มีผลทำให้เกิดเป็นโพรโทพลาสต์ (protoplast) ซึ่งถ้าไม่เลี้ยงไว้ในสภาพที่เหมาะสม เซลล์จะแตกได้ หรือการให้ยาเพนิซิลลินก็มีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

2.5.4.2 เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สารผ่าน (cell permeability)

เยื่อหุ้มเซลล์มีสมบัติยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่เซลล์ ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์นี้ถูกทำลายจะมีผลทำให้ชะงักการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้เซลล์ตายได้ สารเคมีบางอย่าง เช่น ฟีนอล สารซักฟอก สบู่ มีความสามารถที่ไปเปลี่ยนแปลงสมบัตินี้ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา

2.5.4.3 เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก

เซลล์ที่มีชีวิตต้องมีโปรตีน และกรดนิวคลีอิกอยู่ภายในเซลล์ในสภาพปกติหรือเป็นธรรมชาติ ถ้ามีสารเคมีหรือสภาพใด ๆ ที่มาทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไปจากสภาพธรรมชาติ (denature) จะมีผลทำลายเซลล์ได้ เช่น อุณหภูมิสูง สารเคมีความเข้มข้นสูงจะทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนแข็ง ซึ่งจะไม่สามารถแปรสภาพกลับเหมือนเดิมได้อีก

2.5.4.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ต่าง ๆ จำเป็นในปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ ดังนั้นถ้ามีตัวยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ก็จะมีผลต่อปฏิกิริยาของกระบวนการต่าง ๆ เช่น กระบวนการไกลโคลิซิส (glycolysis) วัฏจักรเครปส์ (Kreb's tricarboxylic acid cycle) และระบบ

ไซโตโครม (cytochrome system) สารที่เป็นตัวยับยั้ง ได้แก่ ไซยาไนด์ ยังยับยั้งไซโตโครมออกซิเดส ฟลูออไรด์ยับยั้งไกลโคลิซิส เป็นต้น

สารที่เป็นออกซิไดซิงเอเจนต์อย่างแรง เช่น ฮาโลเจน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจทำลายของค็อกซ์ประกอบของเซลล์จนเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติต่อไปได้ เช่น รวมตัวกับหมู่ซัลไฟไฮไดรล (sulfhydryl) ของเอนไซม์ในเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์จึงไม่ทำงาน นอกจากนี้ยังมีไอออนของโลหะ เช่น เงิน ทองแดง และปรอท ซึ่งจะไปรวมตัวกับหมู่ซัลไฟไฮไดรลของเอนไซม์หรือโปรตีน มีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายได้

2.5.4.5 ป้องกันการสร้างเมแทบอไลต์ (antimetabolites)

เมแทบอไลต์เป็นสารที่จำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ เช่น ในการสังเคราะห์กรดโฟลิก จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้สารกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acid) ซึ่งสารนี้มีโครงสร้างคล้ายกับ ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) ดังนั้นการใช้ซัลฟานิลาไมด์เข้าแข่งทำปฏิกิริยาแทนที่กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ทำให้การสังเคราะห์กรดโฟลิกหยุดชะงัก ดังนั้นการใช้สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับสารเมแทบอไลต์เพื่อไปยับยั้งเมแทบอลิซึมของเซลล์จึงช่วยทำลายจุลินทรีย์ได้

2.5.4.6 การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

สารบางอย่างมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA โดยสารนั้นจะไปขัดขวางการสร้างหน่วยพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก คือ พิวรีนและไพริมิดีน และไปขัดขวางการรวมตัวของนิวคลีโอไทด์เข้าเป็นกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติไป และทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ในที่สุด

2.5.5 ตัวอย่างกลไกการออกฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชมุข

กลไกการต้านจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชมุข คือ สารประกอบฟีนอลิก และวิตามินซี โดยมีรายละเอียด ดังนี้

2.5.5.1 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เหมือนสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยการแทรกวงแหวนเบนซีนเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ อะตอมของไฮโดรเจนของวงฟีนอลจะทำให้ไฮโดรเจนเป็นกรด และทำลายการสังเคราะห์โปรตีน และเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งโปรตอน (H^+) ในจุลินทรีย์ ที่กล่าวมาข้างต้น ถือเป็นกการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ด้วยตัวมันเอง เช่น สูญเสีย ATP

พลังงานต่ำลง ไม่สามารถจำลองตัวเอง และตายในที่สุด (Hyldgaard, Mygind & Meyer, 2012) นอกจากนี้ ฟีนอลจะทำหน้าที่อย่างเฉพาะเจาะจงต่อเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในไซโตพลาสซึมโดยรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่เสถียร โมเลกุลของไลโปฟิลิก (lipophilic) ซึ่งเป็นส่วนที่ละลายในไขมันจะถูกจับไว้โดยฟอสโฟลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยยึดตามกระบวนการที่เกี่ยวข้องดังนี้ ความเข้มข้นต่ำ ส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ (เช่น กรดนิวคลีอิก กรดกลูตามิก) จะถูกปลดปล่อยออกมาที่ตัวกลางภายนอกเซลล์ ถ้าความเข้มข้นสูง สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จะยับยั้งการซึมผ่านของสารดังกล่าว เป็นสาเหตุทำให้โปรตีนของแบคทีเรียเสียสภาพ และเกิดการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ยกตัวอย่าง เช่น ในกรณีของแบคทีเรีย *B. megaterium* ตัวถูกละลายที่อยู่ระหว่างเซลล์ถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่ทดสอบหรือเซลล์ที่อยู่ระหว่างการเจริญเติบโต (ตัวถูกละลายขนาดเล็ก เช่น อนุพันธ์ของโปรตีน) เช่นเดียวกับผลกระทบขั้นที่สองของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์จับอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ของไซโตพลาสซึม

2.5.5.2 กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี

วิตามินซีจะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยไปทำลายสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นกรดให้กับจุลินทรีย์ คือ มีค่าพีเอช (pH) ต่ำ กลไกการทำงานของแอสคอร์บิกมีส่วนคล้ายสารประกอบฟีนอลิก เพียงแต่ไม่เข้าไปแทรกตัวอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Tajkarimi & Ibrahim, 2011)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัสดุดิบ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างพุทราไต้หวัน “พันธุ์ซื่อมี” ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากไร่บุญรอด ตำบลแม่กรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย โดยใช้ผลพุทราขนาดเล็ก ระดับรองจากเกรด C หรือทางไร่บุญรอดเรียกว่า “มูก” เปลือกมีสีเขียว หรือสีเหลืองบ้างเล็กน้อย มีผลสมบูรณ์ ปราศจากบาดแผล ตาหนีจากโรคและแมลง ดังภาพที่ 3.1 (a) โดยเก็บผลหลังจากดอกบาน 45 วัน จากนั้นล้างและเอาเมล็ดออก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์



ภาพที่ 3.1 Taiwanese jujube cv. Zimi, (a) “mook” size, (b) “C” size, (c) “B” size, (d) “A” size

3.2 สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และเชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

- 3.2.1.1 Acetic acid, CH_3COOH , เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Merck, Germany
- 3.2.1.2 Aluminium chloride, AlCl_3 , เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Merck, Germany
- 3.2.1.3 Citric acid เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์ Sigma-Aldrich, USA
- 3.2.1.4 DPPH, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Sigma-Aldrich, USA
- 3.2.1.5 Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Merck, Germany
- 3.2.1.6 Ferric chloride, FeCl_3 , เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Fisher scientific, UK
- 3.2.1.7 Folin-Ciocalteu's reagent เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, CARLO ERBA
- 3.2.1.8 Gallic acid, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Sigma-Aldrich, USA
- 3.2.1.9 L-ascorbic acid, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Fisher scientific, UK
- 3.2.1.10 Metaphosphoric, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Fisher scientific, UK
- 3.2.1.12 Methanol, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, RCI Labscan limited, Thailand
- 3.2.1.11 Potassium hexacyanoferrate, $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$, Merck, Germany
- 3.2.1.13 Quercetin, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Sigma-Aldrich, USA
- 3.2.1.14 Sodium hydroxide, NaOH , เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, RCI Labscan limited, Thailand
- 3.2.1.15 Sodium Nitrite, NaNO_2 , เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Merck, Germany
- 3.2.1.16 Trichloroacetic acid, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์, Merck, Germany
- 3.2.1.17 Trolox, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, เกรดใช้สำหรับการวิเคราะห์ Sigma-Aldrich, USA

3.2.2 สารเคมีที่ใช้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

- 3.2.2.1 Mueller-Hinton broth , BD difco, USA
- 3.2.2.2 Mueller-Hinton agar, BD difco, USA
- 3.2.2.3 Ampicillin, Sigma-Aldrich, USA

3.2.3 จุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ใช้ในการทดลองซื้อจากศูนย์เก็บเชื้อรักษาจุลินทรีย์ ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ยกเว้นเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 6 ชนิด เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบอย่างละ 3 ชนิด ตามลำดับ ได้แก่

3.2.3.1 แบคทีเรียแกรมบวก

1. *Staphylococcus aureus* TISTR1466
2. *Listeria monocytogenes* DMST17303
3. *Bacillus subtilis* TISTR008

3.2.3.2 แบคทีเรียแกรมลบ

1. *Escherichia coli* TISTR780
2. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781
3. *Salmonella typhimurium* TISTR292

3.2.4 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง, S22, Biochrom, Libra, England

3.2.1.3 เครื่องคลื่นอุลตราโซนิก (sonicator), DT 255H, Bandelin Sonorex Digitec,

Germany

3.2.1.4 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator), CCA1110, Eyela, Tokyo rikakikai co., Ltd., Tokyo

3.2.1.5 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน, 2100 Kjeltex, Foss Tecator, USA

3.2.1.6 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน, 2055 Soxtech, Foss Tecator, USA

3.2.1.7 เครื่องวิเคราะห์ใยอาหาร, 1020 Hot extractor; 1021 Cold extractor, Fibertech, Foss Tecator, USA

3.2.1.8 เครื่อง Muffle furnace CWT 1300, Corbolite, England

3.2.1.9 เครื่องปั่น, HR2094, Philips, The Netherlands

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพุทรา

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพุทรา ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐาน (proximal composition) ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ (titratable acidity, TA) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

3.3.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐาน (proximate analysis)

โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพุทราพันธุ์ช่อมี จะใช้ผลสดวิเคราะห์ทั้งเปลือกและเนื้อผลรวมกัน โดยสับให้ละเอียด และนำไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้าใยอาหาร และคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

1. การวิเคราะห์ความชื้น โดยการใช้ตู้อบ (Pearson, 1970)

อบด้วยวัดความชื้นพร้อมฝาน้ำหนัก 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปิดฝาด้วย ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ปิดฝาโถทันที ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมฝา (W_1) ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกค่าน้ำหนัก จากนั้นใส่ตัวอย่างพุทราที่หั่นเป็นชิ้นเล็กประมาณ 3 กรัม ลงในถ้วย บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่าง (W_2) ทำ 3 ซ้ำ นำถ้วยพร้อมฝาปิดที่มีตัวอย่างเข้าอบในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักที่แน่นอน ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมฝาและตัวอย่างแห้ง (W_3) บันทึกไว้เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักรีด และร้อยละของความชื้น ดังสมการ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

$$\% \text{ น้ำหนักแห้ง} = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1} \times 100 \dots \dots \dots (3.1)$$

โดยที่

W_1 = น้ำหนักถ้วยเปล่าพร้อมฝา (กรัม)

W_2 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

$$\text{ความชื้น (\%moisture)} = 100 - \% \text{ น้ำหนักแห้ง} \dots \dots \dots (3.2)$$

2. การวิเคราะห์โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (Association of Analytical Communities [AOAC], 2000)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างปศุสัตว์ที่อบไล่ความชื้นแล้ว 1 กรัม (บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง 4 ตำแหน่ง) คอปเปอร์ซัลเฟต (copper (II) sulphate) กับ โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulphate) ในอัตราส่วน 1:10 (w/w) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาตัวอย่างละ 5 กรัม จากนั้นนำเข้าตู้ดูดควัน และเปิดกรดซัลฟิวริกใส่ลงในหลอดย่อยที่มีตัวอย่างแต่ละหลอด ๆ ละ 12 มิลลิลิตร จึงนำไปเข้าเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45-60 นาที จนสารในหลอดย่อยเปลี่ยนเป็นสีเขียวมรกต จากนั้นเอาตัวอย่างออกจากเครื่องย่อย และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร จะได้สารเป็นสีฟ้าอ่อน นำไปกลั่นในเครื่องกลั่น ดักสารที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายกรดบอริก ร้อยละ 2 (w/v) 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2 - 3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ จึงนำสารดังกล่าวไปไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน และปริมาณโปรตีน ดังสมการ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

$$\frac{\% \text{ ในไตรเจน}}{(\text{Total nitrogen})} = \frac{(A - B) \times C \times 0.014}{D} \times 100 \dots \dots \dots (3.3)$$

$$\% \text{ โปรตีน (Total protein)} = \% \text{ ในไตรเจน} \times 6.25 \dots \dots \dots (3.4)$$

โดยที่

A = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มอลที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มอลที่ใช้ไตเตรทกับ blank

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก

D = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3. การวิเคราะห์ไขมัน (AOAC, 2000)

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม (W_1) บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หรือเบอร์ 4 ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วนำไปใส่ในทิมเบอร์ (thimble) ใช้สำลิวางบนตัวอย่าง นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ปิดไว้ อบด้วยสกัดไขมันที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วย (W_2) ตวงปิโตรเลียมอีเทอร์ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยในครั้งแรก ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ 30 มิลลิลิตร เมื่อสกัดครั้งที่สอง นำทิมเบอร์ที่บรรจุตัวอย่างซึ่งผ่านการอบสอเข้าคอนเดนเซอร์ในส่วนของการ Extraction Unit ของเครื่อง Soxtec สอดถ้วยที่บรรจุปิโตรเลียมอีเทอร์เข้าเครื่อง จุ่มตัวอย่างลงในถ้วยที่มีปิโตรเลียมอีเทอร์และสกัดตัวอย่าง 20 นาที จึงดึงตัวอย่างขึ้นจากตัวทำลาย สกัดต่ออีก 55 นาที เพื่อให้ปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ควบแน่นมาจากคอนเดนเซอร์ ไหลลงมาล้างตัวอย่าง นำถ้วยที่มีไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วย (W_3) ตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ไขมันห่อใส่กระดาษเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ใยอาหาร (crude fiber) ต่อไป คำนวณหาปริมาณไขมัน ดังสมการ 3.5

$$\begin{array}{l} \text{\%ไขมัน} \\ \text{(Crude lipid)} \end{array} = \frac{(W_3 - W_1) \times 100}{W_2} \dots\dots\dots(3.5)$$

โดยที่

W_1 = น้ำหนักถ้วยเปล่า (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

4) การวิเคราะห์เถ้า (AOAC, 2000)

อบถ้วยกระเบื้อง (porcelain dish) ที่แห้งและสะอาดในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้อง (W_1) ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องดังกล่าว บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง (W_2) นำไปเผาในตู้ดูดควันด้วยไฟอ่อนจนหมดควัน แล้วจึงนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาและปล่อยให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก (W_3) เพื่อคำนวณหาปริมาณเถ้า ดังสมการ 3.6

$$\begin{aligned} \% \text{ เถ้า} \\ (\text{Total Ash}) \end{aligned} = \frac{W_3 - W_1}{W_2} \times 100 \dots \dots \dots (3.6)$$

โดยที่

W_1 = น้ำหนักถ้วยเปล่า (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

5. การวิเคราะห์ใยอาหาร (AOAC, 2000)

อบถ้วยครุชีเบล (crusible) ในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักของถ้วยครุชีเบล (W_1) ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว 1.02 กรัม บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง (W_2) นำถ้วยครุชีเบลที่มีตัวอย่างเข้าเครื่องสกัด ใส่สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 1.25 (v/v) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบระยะเวลาย่อย ให้ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนจนหมดฟอง ปรับพีเอชตัวอย่างให้เป็นกลาง เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1.25 (v/v) ลงในคอลัมน์ 150 มิลลิลิตร ย่อยต่อเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบระยะเวลาย่อย ให้ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนจนหมดฟอง ปรับพีเอชของตัวอย่างให้เป็นกลาง นำครุชีเบลที่มีตัวอย่างล้างด้วยอะซีโตน ประมาณ 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักครุชีเบลที่มีตัวอย่างย่อยด้วยกรด และค้างแล้ว (W_3) เผาตัวอย่างที่ผ่านการอบในเครื่องเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ และปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก (W_4) บันทึก เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณใยอาหารในตัวอย่าง ดังสมการ 3.7

$$\begin{aligned} \% \text{ ใยอาหาร} \\ \end{aligned} = \frac{W_4 - W_3}{W_2} \times 100 \dots \dots \dots (3.7)$$

โดยที่

W_2 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

W_4 = น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

6. การคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต (% น้ำหนักสด) คำนวณได้จาก

$100 - (\% \text{ ผลรวมของปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า})$

3.3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดซิตริก (Titratable acidity; TA) (AOAC, 2000)

ไทเทรตน้ำคั้นจากเนื้อพุทราจำนวน 5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้ฟีนอล์ฟทาไลน์ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) จำนวน 1-2 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตจนกระทั่งถึงจุดยุติ คือจุดที่สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู จากนั้นนำค่าปริมาตรสารละลายด่างมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปคำนวณหาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดซิตริก ในหน่วยกรัมกรดซิตริก ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด (g citric acid/ 100 g) จากสมการ 3.8 และสมการ 3.9 ตามลำดับ

$$\% \text{ TA (v/v)} = \frac{(\text{mL NaOH}) \times (\text{N NaOH}) \times (\text{meq.wt of citric acid}) \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}} \dots\dots\dots(3.8)$$

โดยที่

mL NaOH = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต

N NaOH = Normality ของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 N)

meq.wt of citric acid = milli-equivalent weight of citric acid (0.064)

จากนั้นนำค่า %TA (v/w) ไปคำนวณต่อ ดังสมการที่ 3.9

$$\% \text{ TA} \quad = \quad \frac{\% \text{TA (v/w)} \times \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 100} \quad \text{.....(3.9)}$$

(g/100 g)

3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS)

วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ในน้ำคั้นจากเนื้อพุทราด้วย hand refractometer โดยปรับค่า 0 ด้วยน้ำกลั่นก่อนใช้ อ่านค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้หน่วยเป็นร้อยละ โดยวัดตัวอย่างซ้ำละ 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี (Vitamin C) โดยการไตเตรท (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิกในน้ำพุทรา ทำได้โดยใช้กรดเมตาฟอสฟอริก (metaphosphoric acid) 5 มิลลิลิตร กับน้ำพุทรา 2 มิลลิลิตร ไตเตรทกับสารละลายอินโดฟีนอล (indophenol) จนเป็นสีชมพูปรากฏและหายนานกว่า 5 นาที และการคำนวณวิตามินซีในรูป มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิก ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง (mgAA/ 100 g DW) โดยใช้สูตรดังสมการที่ 3.10 และ สมการที่ 3.11 ตามลำดับ

$$F = \frac{W \times W_1}{V_2} \times \frac{1}{(V_s - V_b)} \quad \text{.....(3.10)}$$

โดยที่

W = น้ำหนักของกรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัม)

V1 = ปริมาตรของกรดแอสคอร์บิกที่ใช้ใน (มิลลิลิตร)

V2 = ปริมาตรในการเตรียมกรดแอสคอร์บิก (มิลลิลิตร)

V_s = ปริมาตร indophenol ที่ใช้ในการไตเตรทกรดแอสคอร์บิก (มิลลิลิตร)

V_b = ปริมาตร indophenol ที่ใช้ในการไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

$$\text{Vitamin C} \quad = \quad \frac{V_x \times V_b}{V} \times F \times \frac{V_{ss}}{W} \times \frac{10,000}{\text{DM}} \quad \text{.....(3.11)}$$

(mg/ 100 g DW)

โดยที่

V_x = ปริมาตร indophenol ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_b = ปริมาตร indophenol ที่ใช้ในการไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

F = ค่าที่ได้จากการคำนวณในครั้งแรก (สมการที่ 3.10)

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่กินได้ (กรัม)

10000 = conversion factor converting 1 g FW to 100 g DW

3.3.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพุทราพันธุ์เชียงใหม่

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อพุทรา เวลาในการโซนิเคท (sonication time) และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.3.2.1 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย

แปรอัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลายเป็น 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 และ 3:5 (w/w) โดยใช้เอทานอลร้อยละ 50 (v/v) เป็นตัวทำละลาย จากนั้นปั่นเป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนผสมที่ได้ไปโซนิเคทเป็นเวลา 10 นาที โดยมีการเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 5 นาที เพื่อควบคุมอุณหภูมิของสารสกัด จึงกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และวิตามินซี จากนั้นจึงนำอัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวมากที่สุดไปใช้ในการศึกษาตัวแปรในการสกัดอื่น ๆ ต่อไป

3.3.2.2 ศึกษาเวลาในการโซนิเคท (Sonication time)

โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อพุทราที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.1 โดยใช้เอทานอลร้อยละ 50 (v/v) เป็นตัวทำละลาย นำไปปั่นเป็นเวลา 5 นาที โดยแปรเวลาในการโซนิเคทเป็น 0, 5, 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นกรอง แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และวิตามินซีสูงที่สุด จึงนำไปศึกษาตัวแปรอื่นต่อไป

3.3.2.3 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

แปรตัวทำละลายได้แก่ น้ำ เอทานอลร้อยละ 25, 50 และ 75 (v/v) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อพุทราที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 นำไปปั่นเป็นเวลา 5 นาที และโซนิเคทตามเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 จากนั้นกรอง แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และวิตามินซี

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นแล้ว จึงใช้สภาวะดังกล่าวมาสกัดพืชราก เพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ต่อไป

3.3.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds)

โดยใช้น้ำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากข้อ 3.3.2 เพื่อสกัดพืชราก และนำไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.3.3.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content; TPC) โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton & Rosi, 1965)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) stock 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายกรดแกลลิก 0.10 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต stock สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ปริมาตร 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพืชราก ปิเปตสารสกัดตัวอย่างพืชราก 0.50 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟอลิน (Folin-Ciocalteu) 2.50 มิลลิลิตร และโซเดียมคาร์บอเนต 2.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และใช้น้ำกลั่นเป็น blank

การคำนวณ

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดแกลลิก หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 765 นาโนเมตร หากสมการเส้นตรง $Y = mx + b$ จะได้ค่าความชัน (m) และค่าจุดตัดแกน Y (b) คำนวณปริมาณฟีนอลทั้งหมดในรูป มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (mgGAE/ 100 g DW) ดังสมการ 3.10

$$\text{ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/ 100 g DW)} = \frac{(A_s - b) \times V_s \times DF \times 10,000}{m \times W_s \times DM} \dots\dots\dots(3.10)$$

โดยที่

A_s = ค่าดูดกลืนแสงที่ 765 nm ของตัวอย่าง

b = ค่าจุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐาน (Y- intercept)

V_s = ปริมาตรสารสกัด

DF = Dilution factor

m = ความชันของกราฟมาตรฐาน

W_s = น้ำหนักตัวอย่างพุทรา (กรัม)

DM = % น้ำหนักแห้ง

3.3.3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content; TFC) โดยวิธี Aluminum chloride colorimetric (Zhishen, Mengcheng & Jianming, 1999)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอซีทิน (quercetin) stock 10,000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่งเคอซีทิน 0.03 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ร้อยละ 70 (v/v) ให้ได้ 10 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าว 0, 400, 800, 1200, 1600 และ 2000 ไมโครลิตรลงในขวดวัดปริมาตร และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ร้อยละ 70 (v/v) จนครบ 5 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร ได้เป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 400, 800 1600, 2400, 3200 และ 4000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดพุทรา ปิเปตสารสกัด 0.50 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2.00 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) ความเข้มข้นร้อยละ 5 (w/v) 0.15 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) 0.15 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 (w/v) 2 มิลลิลิตรทันที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร ได้สารละลายสีชมพู ผสมให้เข้ากันโดยใช้เวอร์เทกซ์ ตั้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องอีก 15 นาที จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้เอทานอล ร้อยละ 70 (v/v) เป็น blank

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเคอซีทิน หน่วยเป็นไมโครโมลาร์กับค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ ที่ 510 นาโนเมตร หากค่าสมการเส้นตรง $Y = mx + b$ จะได้ค่าความชัน (m) และค่าจุดตัดแกน Y (b) คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในรูป มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ($\text{mgQE}/100 \text{ g DW}$) ดังสมการ 3.11

$$\text{ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด} = \frac{(A_s - b) \times V_s \times DF \times MW_{\text{quercetin}}}{m \times W_s \times 100 \times DM} \dots\dots\dots(3.11)$$

(mgQE/ 100 g DW)

โดยที่

- A_s = ค่าดูดกลืนแสงที่ 510 nm ของตัวอย่าง
- b = ค่าจุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐาน (Y- intercept)
- V_s = ปริมาตรสารสกัด
- DF = Dilution factor
- $MW_{\text{quercetin}}$ = มวลโมเลกุลของเคออสทิน (302.24 กรัมต่อโมล)
- m = ความชันของกราฟมาตรฐาน
- W_s = น้ำหนักตัวอย่างพุทรา (กรัม)
- DM = % น้ำหนักแห้ง

3.3.3.3 ปริมาณวิตามินซี (Vitamin C) โดยการไตเตรท (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.3.1.4

3.3.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity assay)

ในการทดลองนี้วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในสารสกัดจากพุทราโดยใช้ 2 วิธี คือ วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิธี DPPH radical scavenging activity โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

3.3.4.1 วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie & Strain, 1996)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 10,000 ไมโครโมลาร์ โดยละลายกรดแอสคอร์บิก 0.0176 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 10,000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธี FRAP ในสารสกัดพุทรา ปิเปตสารสกัดพุทราหรือกรดแอสคอร์บิก 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโพแทสเซียมเฮกซะ-ไฮยาโนเฟอร์รอส 1 (w/v) 2.50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำออกมาเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกร้อยละ 10 (w/v) 2.50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.50 มิลลิลิตร และเฟอริกคลอไรด์ร้อยละ 1 (w/v) 0.50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดแอสคอร์บิก หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร กับค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ ที่ 700 นาโนเมตร หากค่าสมการเส้นตรง $Y = mx + b$ จะได้ค่า ความชัน (m) และค่าจุดตัดแกน Y (b) คำนวณฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน วิธี FRAP ซึ่งเป็นการวัด ความสามารถในการรีดิวซ์ (reduce) เฟอริกไซยาไนด์ (ferric cyanide) ในรูปมิลลิกรัมของ กรดแอสคอร์บิก ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง (mgAA/ 100 g DW) ดังสมการ 3.12

$$\text{ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไซยาไนด์} = \frac{(A_s - b) \times V_s \times DF \times 10}{m \times W_s \times DM} \dots\dots\dots(3.12)$$

(mgAA/ 100 g DW)

โดยที่

A_s = ค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm ของตัวอย่าง

b = ค่าจุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐาน (Y- intercept)

V_s = ปริมาตรสารสกัด (กรัม)

DF = Dilution factor

m = ความชันของกราฟมาตรฐาน

W_s = น้ำหนักตัวอย่างพุทรา (กรัม)

DM = % น้ำหนักแห้ง

3.3.4.2 วิธี DPPH radical scavenging activity (Brand, Cuvelier & Berset, 1995)

การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ โดยละลาย DPPH 0.0024 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ด้วยเมทานอล ในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (สารละลายนี้เตรียมใหม่ทุกวันที่ใช้)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (trolox) stock ความเข้มข้น 10,000 ไมโครโมลาร์ ละลายโทรลอกซ์ 0.0250 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 10 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายโทรลอกซ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ 10,000 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0, 100, 200, 300, 400, 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จะได้สารละลายโทรลอกซ์ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ปิเปตสารสกัดพุทรา หรือโทรลอกซ์ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH 1950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งสารละลายผสมไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล เป็น blank

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโทรลอกซ์ หน่วยเป็นไมโครโมลาร์ และ % Inhibition โดยหาได้จากสมการที่ 3.13 จากนั้น หาค่าสมการเส้นตรง $Y = mx + b$ จะได้ค่าความชัน (m) และค่าจุดตัดแกน Y (b) คำนวณฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน วิธี DPPH ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (mgTE/ 100 g DW) ดังสมการ 3.14

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{MeOH}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{MeOH}}} \times 100 \dots \dots \dots (3.13)$$

โดยที่

% Inhibition = ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ

A_{MeOH} = ค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm ของเมทานอล

A_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm ของตัวอย่าง

$$\text{ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันวิธี DPPH} = \frac{(\% \text{ Inhibition} - b) \times V_s \times DF \times MW_{\text{trolox}}}{(m \times W_s \times 100 \times DM)} \quad (3.14)$$

(mgTE/ 100 g DW)

โดยที่

b = ค่าจุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐาน (Y- intercept)

V_s = ปริมาตรสารสกัด

DF = Dilution factor

MWtrolox = มวลโมเลกุลของ Trolox (250.29 กรัมต่อโมล)

m = ความชันของกราฟมาตรฐาน

W_s = น้ำหนักตัวอย่างพุทรา (กรัม)

DM = % น้ำหนักแห้ง

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity assay)

โดยนำสารสกัดจากพุทราที่ได้จากข้อ 3.3.2 มาทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ กับเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด คือ *S. aureus* TISTR 1466, *L. monocytogenes* DMST17303, *B. subtilis* TISTR008 และกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด คือ *E. coli* TISTR780, *P. aeruginosa* TISTR781, *S. typhimurium* TISTR292 ซึ่งจะทดสอบโดยใช้ 2 วิธี คือ วิธีแผ่นยาด้านจุลชีพ (disk diffusion method) และวิธีเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ (broth microdilution method) โดยใช้ 96-well plate โดยมีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

3.3.5.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดด้วยวิธีแผ่นยาด้านจุลชีพ (disk diffusion method) (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2006)

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ กระตุ้นเชื้อแบคทีเรียจากเชื้อในอาหารเลี้ยง โดยใช้ลูป (loop) ถ่ายเชื้อลงบนเพลทที่มีอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) จึงนำมาปรับความขุ่นโดยการเปรียบเทียบความขุ่นกับสารละลาย 0.5 Mcfarland ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็น 10^8 CFU/ml จากนั้นใช้ไม้ปั่นสำลีปลอดเชื้อจุ่มในหลอดทดลองที่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรับความขุ่นแล้ว โดยกดสำลีกับข้างหลอดทดลองให้หมด ๆ แล้วทำการทา (swap) ลงบนผิวหน้าอาหาร MHA ในเพลทอาหาร ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้แห้ง 3-5 นาที จึงนำแผ่นดิสก์ (disk) ซึ่งทำจากกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่มีสารสกัดอยู่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่เตรียมไว้ หรือชุดควบคุมผลบวก (positive control) ชุดควบคุมผลลบ (negative control) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ โดยวางดิสก์ให้ห่างจากขอบเพลทประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร แล้วกดตรง

กลางเบา ๆ เพื่อให้แผ่นดิสก์ติดแนบกับผิวหน้าอาหาร แล้วตั้งทิ้งไว้ 20 - 25 องศาเซลเซียส เวลา 15 - 20 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง

ชุดควบคุมผลบวกจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยใช้ชุดควบคุมผลลบเหมือนกันคือ ตัวทำลายในการสกัด คือ สารละลายเอทานอลร้อยละ 50 (v/v)

ตารางที่ 3.1 Positive control for antimicrobial testing

Bacterial	positive control	Concentration (mg/mL)
S. aureus TISTR1466	Ampicillin	100
B. subtilis TISTR008	Ampicillin	100
L. monocytogeneus DMST17303	Ampicillin	100
E. coli TISTR780	Ampicillin	100
S. typhimurium TISTR292	Ampicillin	100
Pseudomonas aeruginosa TISTR781	Polymyxin	10

การวัดผล วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัดขนาดที่กว้างที่สุด และแคบที่สุด แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยรายงานผลบริเวณยับยั้งหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.3.5.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเจือจางด้วยอาหารเหลว (broth microdilution method) โดยใช้ 96-well plate (CLSI, 2006)

การเตรียมเชื้อ ทำเช่นเดียวกับวิธีแผ่นยาด้านจุลชีพ (3.3.5.1)

การเตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ กัน เติมน้ำในหลุมที่ 2-11 ใน 96 well plate ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยหลุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมปลอดเชื้อ (sterile control; SC) และ หลุมที่ 11 เป็นชุดควบคุมการเจริญของเชื้อ (growth control; GC) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำเพลทเข้าไปอ่านค่าความขุ่นจากเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

(microplate reader) เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibition concentration; MIC) โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่มีความใสใกล้เคียงกับชุดควบคุมปลอดเชื้อ คือค่า MIC จากนั้นนำสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดไปจนถึงความเข้มข้นสูงสุดไปทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration; MBC) โดยใช้ดูปเปี่ย สารสกัดดังกล่าวลงบนเพลทอาหาร MHA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง โดยวัดผลจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เกิดเชื้อบนเพลทอาหาร คือค่า MBC

ตารางที่ 3.2 Preparation control and different concentrations of the extract from stock extract (2 g/ mL) for broth microdilution assay

Well no.	Extract volume (μL)	MHB volume (μL)	culture volume (μL)	Final volume	Final conc. (g/ mL)
1 (SC)	-	200	-	200	-
2	80	20	100	200	0.80
3	75	25	100	200	0.75
4	70	30	100	200	0.70
5	65	35	100	200	0.65
6	60	40	100	200	0.60
7	55	45	100	200	0.55
8	50	50	100	200	0.50
9	45	55	100	200	0.45
10	40	60	100	200	0.40
11	35	65	100	200	0.35
12 (GC)	-	-	200	200	-

หมายเหตุ. conc.: concentration

บทที่ 4

ผล และอภิปรายผลการศึกษา

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของพุทรา

องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของพุทรา คือ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน ใยอาหารหยาบ (crude fiber) และคาร์โบไฮเดรต ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ (titratable acidity; TA) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid; TSS) โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 โดยจากการทดลองพบว่าพุทราพันธุ์ซื่อมีมีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน ใยอาหารหยาบ และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 86.66, 1.05, 1.42, 0.04, 1.18 และ 10.83 ของน้ำหนักสด ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.1 พบว่าพุทราพันธุ์ซื่อมี มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ในรูปกรดซิตริก และปริมาณวิตามินซี เป็น 13.13 องศาบริกซ์ 0.02 กรัม และ 32.12 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ โดยพบว่าพุทราพันธุ์ซื่อมี มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณวิตามินซีอยู่ในช่วงเดียวกับพุทราอินเดีย คืออยู่ในช่วง 13 – 20 องศาบริกซ์ และ 17.25 - 51.98 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ (Williams et al., 2006)

ตารางที่ 4.1 Proximal composition, titratable acidity, total soluble solid and vitamin C of the Zimi cultivar jujube compared to those of Indian jujube

Chemical composition	Amount	
	Zimi cultivar jujube	Indian jujube
Moisture (%)	86.66 $\pm$ 0.09	81.60 – 83 *
Ash (% FW)	1.05 $\pm$ 0.02	0.30 - 0.59 *
Protein (% FW)	1.42 $\pm$ 0.03	0.80 *
Lipid (% FW)	0.04 $\pm$ 0.01	0.07 *
Crude fiber (% FW)	1.18 $\pm$ 0.05	-
Carbohydrate (% FW)	10.83 $\pm$ 0.10	17 *
Titratable acidity (g citric acid/ 100 g)	0.02 $\pm$ 0.00	-
Total soluble solid (°Brix)	13.13 $\pm$ 0.06	13 – 20 **
Vitamin C (mg AA/ 100 g FW)	32.12 $\pm$ 0.95	17.25 - 51.98 **

หมายเหตุ. FW: Fresh weight

ที่มา * Pareek (2013), ** Williams et al., (2006)

4.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพุทราพันธุ์ซิมี่

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพุทรา ที่ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content: TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content: TFC) และปริมาณวิตามินซีสูงสุด มีรายละเอียดของผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.2.1 ผลของอัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย

ผลการแปรอัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย เป็น 1 : 5, 1 : 3, 1 : 2, 3 : 5 และ 1 : 1 (w/w) โดยใช้เอทานอลร้อยละ 50 (v/v) เป็นตัวทำละลาย และเวลาในโซนิกเทเป็นเวลา 10 นาที แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายในการสกัด สามารถทำให้ TPC ในสารสกัดเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาณพุทราไปด้วย ทำให้ปริมาณ TPC ในสารสกัดเพิ่มขึ้นได้อีก ระดับหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ong and Law (2012) ที่รายงานว่า เมื่อปริมาณตัวทำละลายมากขึ้นจะสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้น เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลายให้มากขึ้นจะทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสารเพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.2 Bioactive compounds of jujube extracts obtained from different jujube-to-solvent ratios using 50 % ethanol as a solvent with 10 min sonication time for extraction

Ratio (w/w) (Jujube : 50 % Ethanol)	TPC (mgGAE/ 100 g DW)	TFC (mgQE/ 100 g DW)	Vitamin C (mgAA/ 100 g DW)
1 : 1	679.05± 0.53 ^d	269.44±11.23 ^b	29.51±0.37 ^a
1 : 2	1142.80±11.40 ^c	383.44±26.42 ^a	28.39±0.45 ^a
1 : 3	1383.28±18.77 ^b	418.98±59.02 ^a	28.70±0.95 ^a
1 : 5	1409.58±44.99 ^b	301.98±19.53 ^b	29.67±2.98 ^a
3 : 5	1565.47±51.98 ^a	419.58±11.73 ^a	29.18±1.56 ^a

หมายเหตุ. TPC: Total phenolic content

TFC: Total flavonoid content

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (P < 0.05)

อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายจาก 1 ส่วน (1 : 1) เป็น 2 ส่วน (1 : 2) พบว่าปริมาณ TFC ในสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายจาก 2 ส่วน (1 : 2) เป็น 3 ส่วน (1 : 3) ในขณะที่ปริมาณพุทรายังคงเท่าเดิมพบว่า ปริมาณ TFC ใน

สารสกัดมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลาย จาก 3 ส่วน (1 : 3) เป็น 5 ส่วน (1 : 5) ปริมาณ TFC ในสารสกัดมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายจะสามารถไปเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารของตัวทำละลาย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อปริมาณของตัวทำละลายมากขึ้นประสิทธิภาพของการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของตัวทำละลายอาจลดลงได้เช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณตัวทำละลายมากขึ้นทำให้ความสามารถในการละลายของสารชนิดอื่นเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งสารดังกล่าวอาจมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้มากกว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เราสนใจ ทำให้ปริมาณสารที่เราต้องการถูกละลายออกมาได้น้อยลง (Deng et al., 2013; Xia et al., 2011) และเมื่อเพิ่มเนื้อพุทราในขณะที่มีปริมาณของตัวทำละลายเท่าเดิม พบว่าในสารสกัดมีปริมาณ TFC มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเนื้อพุทราที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราส่วนของพุทราต่อตัวทำละลายไม่มีผลต่อปริมาณวิตามินซี โดยปริมาณวิตามินซีหลังจากการสกัดลดลงถึงประมาณ 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซีจากน้ำพุทรากั้นสด (240 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง) ทั้งนี้เนื่องมาจากวิตามินซีเสื่อมสลายได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อน แสง หรือสารเคมีบางชนิด (Micucci, Rosario, Turner, Davicino & Anesini, 2011)

ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ 3 : 5 ซึ่งจะได้นำไปใช้ในการศึกษาตัวแปรของสภาวะในการสกัดพุทราอื่น ๆ ต่อไป

4.2.2 ผลของเวลาในการโซนิเคต

ผลการแปรเวลาในการโซนิเคตเป็น 0, 5, 10, 15, 30, 45 และ 60 นาที โดยใช้เอทานอลร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลาย และอัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย เป็น 3 : 5 แสดงดังตารางที่ 4.3 โดยจากการทดลองพบว่าการโซนิเคตทำให้ TPC เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ TPC ในสารสกัดที่ได้จากการปั่นอย่างเดียว (โซนิเคตที่ 0 นาที) ขณะที่การโซนิเคตที่เวลาต่าง ๆ กันไม่มีผลต่อปริมาณ TPC ที่ได้ ในขณะที่ TFC ของสารสกัดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการโซนิเคตจาก 5 นาที เป็น 10 นาที ปริมาณ TFC ในสารสกัดคงที่เมื่อเพิ่มเวลาในการโซนิเคตจาก 10 นาที เป็น 45 นาที แต่ TFC มีปริมาณลดลงเมื่อเวลาในการโซนิเคต เป็น 60 นาที ทั้งนี้อาจเนื่องจากการโซนิเคตไปทำให้ผนังเซลล์แตก ซึ่งการแตกของผนังเซลล์ทำให้ปริมาณ TFC เพิ่มขึ้นในช่วงแรก เมื่อเวลาในการโซนิเคตเพิ่มขึ้นทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น ถึงระยะเวลาหนึ่งปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีปริมาณคงที่ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากคลื่นเสียงจากการโซนิเคตทำให้เกิดการสั่น

(acoustic cavitation) และเกิดการแตกของเซลล์พืชทำให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้ มีปริมาณมากขึ้น เมื่อการแตกของเซลล์สมบูรณ์ สารที่ไม่ละลายน้ำ หรือไขมันที่แขวนลอยในเซลล์ จะไปขัดขวางการซึมผ่านของตัวทำละลาย ทำให้สารออกฤทธิ์ดังกล่าวมีปริมาณคงที่และลดลง ตามลำดับ (Wang, W. et al., 2011) นอกจากนี้ในกรณีของ TFC อาจมีการสลายตัวของ สารประกอบฟลาโวนอยด์ได้เมื่อโซนิเคตเป็นระยะเวลานาน ๆ (Annegowda, Anwar, Mordi, Ramanathan & Mansor, 2010)

ตารางที่ 4.3 Bioactive compounds of jujube extracts obtained from different sonication times using 50 % ethanol as a solvent with the jujube-to-solvent ratio of 3 : 5 for extraction

Sonication time (min)	TPC (mgGAE/ 100 g DW)	TFC (mgQE/ 100 g DW)	Vitamin C (mgAA/ 100 g DW)
0	1490.21± 47.09 ^b	214.97± 8.08 ^d	21.87± 0.38 ^a
5	1569.42± 126.09 ^a	229.42± 7.09 ^c	24.89± 0.47 ^a
10	1534.83± 39.15 ^a	251.36± 10.21 ^{ab}	25.21± 0.87 ^a
15	1551.31± 50.13 ^a	250.70± 5.14 ^{ab}	23.46± 0.95 ^a
30	1559.48± 111.68 ^a	256.90± 23.62 ^a	22.50± 0.44 ^a
45	1599.79± 21.00 ^a	241.97± 4.18 ^{bc}	20.32± 0.52 ^a
60	1422.90± 151.78 ^b	208.33± 11.47 ^d	20.86± 0.38 ^a

หมายเหตุ. TPC: Total phenolic content

TFC: Total flavonoid content

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (P < 0.05)

ดังนั้น เวลาในการโซนิเคทที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญในพุทรา คือ 10 นาที ซึ่งจะได้นำไปใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อศึกษาตัวแปรอื่นในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

4.2.3 ผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ผลการแปรชนิดของตัวทำละลาย เป็น น้ำ เอทานอลร้อยละ 25, 50 และ 75 (v/v) โดยใช้ อัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย เป็น 3 : 5 และเวลาในการโซนิเคท 10 นาที แสดงดัง ตารางที่ 4.4 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบจะสามารถสกัด TPC และ TFC จากพุทราได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cardozo, Ordonez, Alberto, Zampini, & Isla (2011) และ Kim and Son (2011)

ตารางที่ 4.4 Bioactive compounds of jujube extracts obtained from different solvents using the jujube-to-solvent ratio of 3 : 5 with 10 min sonication time for extraction

Solvent (v/v)	TPC (mgGAE/ 100 g DW)	TFC (mgQE/ 100 g DW)	Vitamin C (mgAA/ 100 g DW)
Water (0 % Ethanol)	1031.07± 66.14 ^c	501.47±45.18 ^b	20.46±1.12 ^a
25 % Ethanol	1799.06±221.45 ^b	617.04±49.41 ^a	19.38±1.10 ^a
50 % Ethanol	2004.66± 43.69 ^a	628.58±41.98 ^a	19.23±0.65 ^a
75 % Ethanol	2018.01± 35.43 ^a	634.65±39.49 ^a	18.27±2.41 ^a

หมายเหตุ. TPC: Total phenolic content

TFC: Total flavonoid content

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (P < 0.05)

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายมากขึ้น จะทำให้ปริมาณ TPC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จนกระทั่งความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายเป็นร้อยละ 50 แต่ปริมาณ TPC ในสารสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มปริมาณของเอทานอลในตัวทำละลายจากร้อยละ 50 เป็นร้อยละ 75 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jokic, Velic, Bilic, Bucic-kojic, Planinic & Tomas (2010) ที่กล่าวว่าเอทานอลร้อยละ 50 ในน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เมื่อปริมาณน้ำในตัวทำละลายมีเพิ่มขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารดังกล่าวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอลบริสุทธิ์ ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl: -OH group) ในโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อน้ำตาลอยู่ในโครงสร้างเป็นสารประกอบที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งสามารถละลายได้ดีในสารละลายน้ำ-เอทานอลมากกว่าเอทานอลบริสุทธิ์ (Radojkovica et al., 2012)

แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าถึงแม้ว่าสารละลายน้ำ-เอทานอลสามารถเพิ่มปริมาณ TFC ในสารสกัดได้ เช่นเดียวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิก แต่ปริมาณ TFC ในสารสกัดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปริมาณเอทานอลในตัวทำละลายเพิ่มขึ้น ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานวิจัย ที่รายงานว่าสารละลายเอทานอล-น้ำสามารถเพิ่มปริมาณ TFC ในสารสกัดได้ และเมื่อปริมาณเอทานอลในตัวทำละลายมีมากขึ้นปริมาณ TFC จะมีค่าคงที่และลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายมากขึ้นจนเข้าใกล้เอทานอลบริสุทธิ์ (Chew et al., 2011; Wang, W. et al., 2011; Radojkovica, 2012) นอกจากนี้การใช้น้ำร่วมกับเอทานอลจะทำให้สารประกอบฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์เพิ่มมากขึ้นอาจเนื่องจากน้ำทำให้เซลล์พืชเกิดการบวมทำให้เอทานอลที่เป็นตัวทำละลายสามารถทะลุผ่านเซลล์ได้ดีขึ้น (Chew et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตาม ชนิดของตัวทำละลายดังกล่าวไม่มีผลต่อปริมาณวิตามินซี โดยสารสกัดจากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีปริมาณเอทานอลต่างกันมีปริมาณวิตามินซีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่า เอทานอลร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวจากเนื้อผลพุทรา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกในพุทราเป็นสารประกอบประเภทที่มีความเป็นขั้วในระดับปานกลาง (moderate polar characteristics) นอกจากนี้ Wang, W. et al. (2011) ยังกล่าวว่าหากความเข้มข้นของเอทานอลเกินร้อยละ 50 จะเป็นพิษต่อร่างกาย ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ดังนั้นสารสกัดที่ใช้เอทานอลร้อยละ 50 หรือต่ำกว่าเท่านั้นที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอาหารได้ ดังนั้นชนิดของ

ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญจากพุทรา คือ เอทานอลร้อยละ 50 (v/v) ซึ่งจะได้นำไปใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดต่อไป

4.3 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจากสกัดพุทราพันธุ์ช่อมี

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณวิตามินซี และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ DPPH radical scavenging activity ซึ่งสกัดโดยสภาวะที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลอง 4.2.1 – 4.2.3 แสดงดังตารางที่ 4.5

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า พุทราพันธุ์ช่อมี มีปริมาณ TPC 1,721.59 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง มีปริมาณ TFC เป็น 530.91 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งและวิตามินซี 33.57 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบกับพุทราพันธุ์ช่อมีกับพุทราพันธุ์อื่น ๆ พบว่าพุทราพันธุ์ช่อมี มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าพุทราจีนและพุทราอินเดีย และวิตามินซีอยู่ในช่วงเดียวกับพุทราจีน (Li et al., 2007; Zhang et al., 2010; Cardozo et al., 2011; Das, 2012; Singh, Guizani, Essa, Rahman & Selvaraju, 2012)

สารสกัดจากพุทรา มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของพุทราพันธุ์ช่อมี ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการรีดิวซ์อออนเฟอร์ริก (Fe^{3+}) เป็นอออนเฟอร์รัส (Fe^{2+}) เป็น 8759.54 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH เป็น 2591.30 มิลลิกรัมสมมูลของไทโรลอคซ์ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี FRAP พบว่าพุทราพันธุ์ช่อมี มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันอยู่ในช่วงเดียวกับพุทราจีน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH พบว่าพุทราพันธุ์ช่อมี มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าพุทราจีน แสดงดังตารางที่ 4.5

จากการทดลองพบว่าสารสกัดพุทรา มีปริมาณ TPC สูง และมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP สูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Meda et al. (2008) ที่กล่าวว่า FRAP เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ของสารประกอบฟีนอลิก

ตารางที่ 4.5 Bioactive compounds and antioxidant activities of jujube extract

Bioactive compounds	Zimi cultivar	Chinese jujube*	Indian jujube**
TPC (mgGAE/ 100g DW)	1721.59±13.05	557.00 – 1644.00	1040.00 – 1240.00
TFC (mgQE/ 100g DW)	530.91± 6.18	217.00 – 390.00	-
Vitamin C (mgAA/ 100 g DW)	33.57± 0.51	33.00 – 535.00	780.00 – 930.00
Antioxidant activities	Zimi cultivar	Chinese jujube***	
FRAP (mgAA/ 100 g DW)	8759.54±150.27	6023.00 – 20659.00	-
DPPH (mgTE/ 100 g DW)	2591.30± 26.85	90.10	-

หมายเหตุ. mgGAE/ 100 g DW: mg gallic acid equivalents/ 100 g of dry weight

mgQE/ 100 g aDW: mg quercetin equivalents/ 100 g of dry weight

mgAA/ 100 g DW: mg ascorbic acid/ 100 g of dry weight

mgTE/ 100 g DW: mg trolox equivalent/ 100 g of dry weight

ที่มา *: Li et al. (2007), Zhang et al., (2010), Cardozo et al., (2011), Singh et al. (2012)

** : Das (2012)

***: Li et al. (2007), Plastinaa, Bonofiglio, Vizza, Fazioa, Rovito, Giordano, Barone, Catalano & Gabriele (2012)

ดังนั้นกล่าวได้ว่าสารสกัดจากพุทรา มีศักยภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ เนื่องจากให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันในทั้งสองวิธี

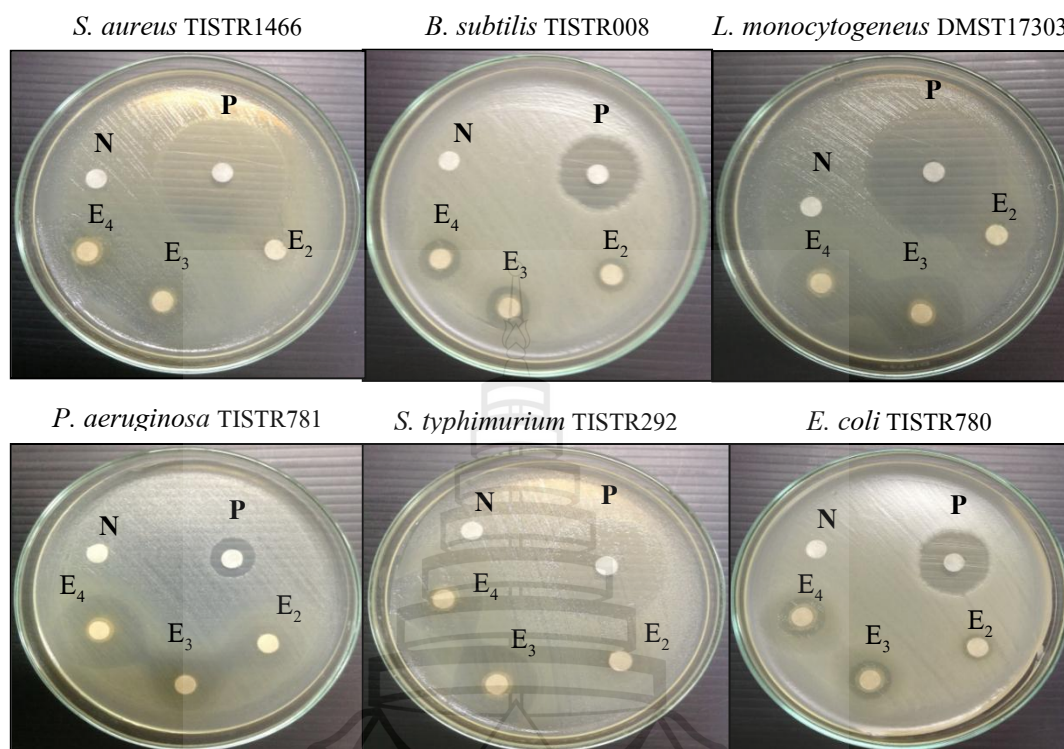
4.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) จากสารสกัดพุทราพันธุ์เชียงใหม่

โดยทำการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ ด้วยวิธีแผ่นยาด้านจุลชีพ (disk diffusion method) และวิธีเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ (broth microdilution method) โดยใช้ 96-well plate โดยผลการทดสอบ มีดังนี้

4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk diffusion method

โดยการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี disk diffusion method ของสารสกัดพุทราที่สกัดโดยใช้สภาวะการสกัดที่ได้จากผลการทดลองข้อ 4.2 คือใช้อัตราส่วนของพุทราต่อตัวทำละลาย ทำการโชนิกเป็นเวลา 10 นาที และใช้เอทานอลร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลาย โดย ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสกัดไม่เพียงพอ จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีระเหยภายใต้สุญญากาศและความดัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จึงได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นมากขึ้นที่มีลักษณะข้นหนืด หรือเรียกว่า “สารสกัดหยาบ” และเตรียมความเข้มข้นของสารสกัด เป็น 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กรัมต่อมิลลิลิตรไปทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ จากผลการทดสอบพบว่า มีเพียงสารสกัดพุทราที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 กรัมต่อมิลลิลิตร เท่านั้นที่มีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ โดยแสดงดังภาพที่ 4.1 และสรุปขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ดังตารางที่ 4.6

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดพุทรามีแนวโน้มยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ สังเกตได้จากบริเวณยับยั้งบนเพลทอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมีขนาดใหญ่กว่าบริเวณยับยั้งบนเพลทอาหารที่มีแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดอื่น ๆ (Abalaka et al., 2010; Naili et al., 2010) ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสมบัติของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดยแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไทโซอิก (teichoic acids) และชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan layer) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนและหนากว่า โดยประกอบด้วยช่องพอริน (porin channels) ลิโปโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides) ลิโปโปรตีน (lipoproteins) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan layer) และช่องว่างเพอริพลาสมิก (periplasmic space) ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ทำให้การผ่านเข้าออกสารสกัดพุทราเป็นไปได้ยาก (Coley, 2005)



หมายเหตุ. N: negative control, P: positive control, E₂, E₃ & E₄: jujube extracts at 2, 3 & 4 g/mL

ภาพที่ 4.1 Inhibitory effect of jujube extract against *S. aureus* TISTR1466, *B. subtilis* TISTR008, *L. monocytogenes* DMST17303, *P. aeruginosa* TISTR781, *S. typhimurium*, TISTR292 & *E. coli* TISTR780

เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าสารสกัดพุทราสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR1466 ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *L. monocytogenes* DMST17303 และ *B. subtilis* TISTR008 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Desniar, Rusmana, Suwanto and Mubarik (2013) ที่กล่าวว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR1466 ได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารโพลีฟีนอลในพุทราสามารถระงับการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) ของเชื้อ *S. aureus* TISTR1466 ได้ (Gautam, Jain & Kumar, 2011) และการที่สารสกัดพุทราสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ได้ (Chaisri & Chuaybamroong, 2011)

ตารางที่ 4.6 Antimicrobial activities (diameter of inhibition zone, mm) of the jujube extract

Bacterial	Diameter of inhibition zone (mm)						Ampicillin	Polymyxin
	0.5 g/mL	1 g/mL	2 g/mL	3 g/mL	4 g/mL			
<i>S. aureus</i> TISTR1466	ND	ND	25.0	30.0	29.0	40.0		
<i>B. subtilis</i> TISTR008	ND	ND	10.0	14.0	14.2	22.0		
<i>L. monocytogeneus</i> DMST17303	ND	ND	22.0	25.0	29.0	40.0		
<i>E. coli</i> TISTR780	ND	ND	16.0	24.5	25.0	36.0		
<i>S. typhimurium</i> TISTR292	ND	ND	10.0	12.0	14.0	21.0		
<i>P. aeruginosa</i> TISTR781	ND	ND	20.0	22.0	28.0			13.0

หมายเหตุ. ND: not detected

เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าสารสกัดพุทราสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR1466 ได้มากที่สุด และสามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR781 ได้มากกว่า *E. coli* TISTR780 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abubaker, Ehsan and Bipinraj (2010) ที่รายงานว่า สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* ได้น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อ *S. typhimurium* มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้าง multidrug efflux pump จึงทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิด (Luvira, 2006) และอาจทำให้เกิดเชื้อดื้อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพุทราได้

4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเจือจางด้วยอาหารเหลว (broth microdilution method) โดยใช้ 96-well plate

โดยวิธี broth microdilution จะสามารถหาปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum bactericidal concentration; MBC) โดยนำสารสกัดพุทราหยาบมาทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 Antimicrobial activities (MIC and MBC) of the jujube extract

Gram	Bacterial	Antimicrobial activity of jujube extract	
		MIC (g/ mL)	MBC (g/ mL)
Positive	<i>S. aureus</i> TISTR 1466	0.40	0.75
	<i>B. subtilis</i> TISTR 008	0.50	0.75
	<i>L. monocytogenes</i> DMST 17303	0.50	0.75
Negative	<i>E. coli</i> TISTR 780	0.75	1.00
	<i>S. typhimurium</i> TISTR 292	0.75	1.00
	<i>P. aeruginosa</i> TISTR 781	0.45	1.00

จากตารางที่ 4.7 พบว่าสารสกัดพุทราสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งจะเห็นได้จากค่า MIC และ MBC ของสารสกัดสำหรับสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกต่ำกว่า MIC และ MBC ของสารสกัดสำหรับแบคทีเรียแกรมลบ โดยให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี disk diffusion method คือสารสกัดพุทราสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 ได้มากที่สุด และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* ได้น้อยที่สุด กล่าวได้ว่าสารสกัดจากพุทราสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดได้ จึงมีศักยภาพในการนำไปเป็นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

พุทรามีองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณกรดทั้งหมดที่-ไฮเดรตได้ในรูปกรดซิตริก และปริมาณวิตามินซีใกล้เคียงกับพุทราอินเดีย โดยสภาวะการสกัดมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด แต่ไม่มีผลต่อปริมาณวิตามินซี สภาวะที่เหมาะสมกับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพุทรา คือ อัตราส่วนระหว่างพุทราต่อตัวทำละลาย 3:5 (w/w) เวลาในการโซนิเคท 10 นาที และใช้เอทานอลร้อยละ 50 (v/v) ในการสกัด โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายร่วมกับพุทราทำให้ได้ปริมาณ TPC และ TFC สูงขึ้น และการโซนิเคททำให้ได้ปริมาณ TPC และ TFC สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดที่ไม่มีการโซนิเคท โดยที่เวลาในการโซนิเคทไม่มีผลต่อปริมาณ TPC และ TFC ในสารสกัด และการใช้สารละลายน้ำ-เอทานอลสามารถสกัด TPC และ TFC ได้มากกว่าการใช้น้ำในการสกัด และสารละลายน้ำ-เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพุทรา อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลในตัวทำละลายเข้าใกล้เอทานอลบริสุทธิ์ประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพุทราจะลดลง

พุทราพันธุ์ชื้อนี้มีปริมาณ TPC และ TFC สูงกว่าพุทราจีนและพุทราอินเดีย และวิตามินซีอยู่ในช่วงเดียวกับพุทราจีน ซึ่งมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH สูงกว่าพุทราจีน และมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP อยู่ในช่วงเดียวกับพุทราจีน นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP มีความสัมพันธ์กับปริมาณ TPC

สารสกัดจากพุทราสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 6 ชนิด โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกสารสกัดจากพุทราสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR1466 ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Listeria monocytogenes* DMST17303 และ *Bacillus subtilis* TISTR008 ส่วนกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* TISTR292 ได้น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ *Escherichia coli* TISTR780 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781 ตามลำดับ

ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดจากพุทรามีศักยภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ซึ่งสามารถนำสารสกัดพุทราไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารหรืออื่น ๆ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ในขณะที่คุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการทางอาหาร ยังคงเดิม และไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าปริมาณวิตามินซีซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ชนิดหนึ่งในพุทราที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณวิตามินซีในน้ำพุทราคั้นสด ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากค่าพีเอชของตัวทำละลายในกระบวนการสกัดไม่เหมาะสม ทำให้วิตามินซีสลายตัวไปในระหว่างขั้นตอนการสกัดในสารสกัดซึ่งมี ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงควรแปรค่าพีเอชของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเพื่อหาสภาวะที่ทำให้วิตามินซีในสารสกัดคงตัวมากขึ้น





รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

- กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์การยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์. (2013). สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2555. จาก <http://www.thaieditorial.com>.
- ทวีศักดิ์ ชัยเรืองรอง. (2552). การปลูกพุทราได้หัวในในประเทศไทย. *วารสารเส้นทางกลีกรม*, 169, 7-8.
- นิตดา หงส์วิวัฒน์ และทวีทอง หงส์วิวัฒน์. (2552). ผลไม้ ๑๑๑ ชนิด คุณค่าอาหารและการกิน, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แสงแดด.
- วรพล เองวานิช. (2555). *อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ*. เชียงใหม่: นวัตกรรมสุขภาพ สำนักพิมพ์.
- สรรพคุณของพุทราจีน. (2554). สืบค้นเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2554 จาก <http://healthypstoday.exteen.com/20100910/entry-2>
- สำนักงานเกษตรจังหวัดเชียงราย. (2553). สถิติการปลูกไม้ผลไม้ยืนต้น ปี 2552. สืบค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2553 จาก <http://www.chiangrai.doae.go.th/>
- Abalaka, M. E., Daniyan, S. Y. & Mann, A. (2010). Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spinachristi* L.) on some microbial pathogens. *African. Pharmacy and Pharmacology*, 4, 135-139
- Abubaker, A. Z., Ehsan, B. R. & Bipinraj, N. K. (2010). Antimicrobial activity of six Indian spices. *Biotechnology*, 40 – 45.
- Agricultural Research Service United States Department of Agriculture. (2013). *Nutrition of Jujube*. สืบค้นเมื่อ 9 สิงหาคม 2555 จาก <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2327?qlookup=09146&format=Full&max=25&man=&lfacet=&new=1>

- Ahmad, B., Khan, I., Bashir, S., Azam, S. & Hussain, F. (2011). Screening of *Zizyphus jujuba* for antibacterial, phytotoxic and haemagglutination activities. *Biotechnology*, 10, 2514-2519
- Akardere, E., Ozer, B., Celem B.E. & Onal, S. (2010). Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast. *Separation and Purification Technology*, 72, 335-339.
- Al-Mohizea IS, El-Behery MM & Hablass MA. (1986). Physico-chemical characteristics of jujube fruits grown in the central region of Saudi Arabia. *College of Agriculture King Saud University*, 8, 337-344.
- Annegowda, H.V., Anwar, L.N., Mordi, M.N., Ramanathan, S. & Mansor, S.M., 2010, Influence of Sonication on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Terminalia catappa* L. Leaves, *Pharmacognosy*, 2, 368-73
- Association of Analytical Communities (AOAC). (17th ed.). (2000). USA: *Official methods of analysis of AOAC International*.
- Benzie, I.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Brand, W.W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (9th ed.). (2006). USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Canadian Nutrient File (2010). *Food Sources of Vitamin C*. Dietitians of Canada. สืบค้นเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2555. จาก <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/index-eng.php>
- Cardozo, M. L., Ordonez, R. M., Alberto, M. R., Zampini, I. C. & Isla, M. I. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activity characterization and genotoxicity evaluation of *Ziziphus mistol* ripe berries, exotic Argentinean fruit. *Food Research International*, 44, 2063 –2071

- Chaisri, R. & Chuaybamroong, P. (2011). Disinfection of *Bacillus subtilis* spores in water using Fenton. *KKU Research Journal*, 16, 1.
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M. & Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18, 1427-1435.
- Contreras-Calderon, J., Calderon-Jaimes, L., Guerra-Hernandez, E. & Garcia-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food research International*, 10.1016 -11.003.
- Coyle, M. B. (2005). Washington: University of Washington.
- Das, S. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of green and ripe fruits of *Averrhoa Carambola* Linn. and *Zizyphus Mauritiana* Lam. *Pharmaceutical and Clinical*, 5, 102-105.
- Desniar, Rusmana, I., Suwanto, A. & Mubarik, N. R. (2013). Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25, 489-494.
- FAO & WHO. (2002). Rome: FAO Corporate document repository.
- Friedli, G.L. (2013). โครงสร้าง Coumatins. สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2555. จาก <http://www.friedli.com/herbs/phytochem/coumarins.html>.
- Gao, Q.H., Wu, C.S. & Wang, M. (2013). The jujube (*Ziziphus Jujuba* Mill.) fruit: A review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3351- 3363.

- Gautam, S., Jain, A. K. & Kumar, A. (2011). Potential antimicrobial activity of *Zizyphus nummularia* against medically important pathogenic microorganisms. *Traditional Medicines*, 6.
- Huang, W.Y. & Cai, Y.Z. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62, 1-20.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. & Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Microbiology*, 3, 1 – 24.
- Jokic, S., Velic, D, Bilic, M., , Bucic-kojic, A., Planinic, M. & Tomas, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Journal of Food Sciences*, 28, 206-212.
- Kim, Y. J. & Son, D. Y. (2011). Antioxidant effects of solvent extracts from the dried jujube (*Zizyphus jujube*) sarcocarp, seed, and leaf via sonication. *The Food Science and Biotechnology*, 20, 167-173.
- Leal ICR, dos Santos, KRN, Itabaiana Jr. I, Antunes, OAC, Porzel A, Wessjohann L, Kuster RM. (2010). Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro* – An Anti-Staphylococcal Evaluation, *Planta Medica*, 76, 47-52.
- Li, J-W., Ding, S-D., & Ding, X-L. (2005). Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40, 3607-3613.
- Li, J.W., Fan, L.P., Ding, S.D., Ding, X.L. (2007). Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food Chemistry*, 103, 454–460.
- Liang, S. & Juan, J. (2011). Effect of jujube extract on oxidative injury in heart muscles of exhausted training rats. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 1896-1899.
- Linster, C. L. & Schaefgen, E.V. (2006). Vitamin C biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS Journal*, 10, 1742 - 4658.

- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of Action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479–3485.
- Luvira, V. (2006). Overveiw of antibiotic resistance. *Songklanagarind Medical*, 24, 453-459.
- Mahesh, B. & Satish, S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *Agricultural Sciences*, 4, 839-843.
- Meda, A. L., Lamien, C. E., Compaore, M. M. Y., Meda, R. N. T., Kiendrebeogo, M., Zeba, B., Millogo, J. F. & Nacoulma, O. G. (2008). Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, 13, 581-594.
- Moraes-Barros, H. R., Castro Ferreira, T. A. P. & Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134, 1892–1898.
- Naczki, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41, 1523–1542.
- Naili, M. B., Alghazeer, R. O., Saleh, N. A. & Al-Najjar, A. Y., (2010) . Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 79–84.
- National Agricultural Library. (2012). องค์ประกอบทางเคมีและค่าพลังงานของผลไม้บางชนิด. สืบค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2555. จาก <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
- National Institute of Standards and Technology. (2012). โครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี. สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2555. จาก http://wtt-pro.nist.gov/wtt-pro/index.html?cmp=l-ascorbic_acid.v
- Ohta, S. & Kimura, A. (2007). Impacts of climate changes on the temperature of paddy waters and suitable land for rice cultivation in Japan, *Agricultural and Forest Meteorology*, 147, 186–198

Ong, S. P. & Law, C. L. (2012). *Extraction of antioxidant phenolic compounds from salak fruit.*

สืบค้นเมื่อ 30 ธันวาคม 2555 จาก

http://www.cirg.ageng2012.org/images/fotosg/tabla_137_C1542.pdf.

Pareek, S. 2013. Nutritional composition of jujube fruit. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 6, 463-470.

Pawlowska, M. A., Camangi, F., Bader, A., Braca, A. (2009). Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chemistry*, 112, 858–862.

Pearson, D. (6th ed). (1970). London: J & A Churchill.

Plastinaa, P., Bonofiglio, D., Vizza, D., Fazioa, A. Rovito, D., Giordano, C., Barone, I., Catalano, S. & Gabriele, B. (2012). Identification of bioactive constituents of *Zizyphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 325– 332.

Popenoe, W. (2011). *Manual Of Tropical And Subtropical Fruits*. สืบค้นเมื่อ 24 มกราคม 2554, จาก <http://chestofbooks.com/gardening-horticulture/fruit/Tropical-And-Subtropical-Fruits/The-Jubube-Zizyphus-Spp.html>.

Radojkovica, M., Zekovica, Z., Jokicb, S. & Vidovica, S. (2012). Determination of optimal extraction parameters of mulberry leaves using Response Surface Methodology (RSM). *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7296 – 7308.

Ross, J. A. & Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19–34.

Singleton, V. L. & Rossi J. A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, 16, 144-158.

- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S, Luximon-Rammaa, A., Aruomab, O. I. & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200 - 213.
- San, B. & Yildirim, A. N. (2010). Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections, *Food Composition and Analysis*, 23, 706-710.
- Sengbusch, P. (2003). โครงสร้างอย่างง่ายของแทนนิน. สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2555 จาก <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/11.htm>.
- Singh, V., Guizani, N., Essa, M. M., Rahman, M. S. & Selvaraju, S. (2012). In vitro antioxidant activities of *Ziziphus spina-christi* fruits (Red Date) grown in Oman. *Biotechnology*, 11, 209 - 216.
- Sun, Y.F., Liang, Z.S., Shan, C.J, Viernstein, H. & Unger, F., 2011, Comprehensive evaluation of natural antioxidants and antioxidant potentials in *Ziziphus jujuba* Mill. var. spinosa (Bunge) Hu ex H.F. chou fruits based on geographical origin by TOPSIS method, *Food Chemistry*, 124, 1612-1619.
- Taati, M., Allirezaei, M., Moshkatsadat, M. H., Rasoulia, B., Moghadasi, M., Sheikhzadeh, F. & Sokhtezari, A. (2011). Protective effects of *Ziziphus jujuba* fruit extract against ethanol-induced hippocampal oxidative stress and spatial memory impairment in rats. *Medicinal plants research*, 5, 915-921.
- Tajkarimi, S. & Ibrahim, S. A. (2011). Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*, 22, 801-804.
- Wang, Q., Liu, H., Du, J., Cui, J., Chen, G. & Liu, Y. (2011). Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions using orthogonal matrix design to enhance the antimicrobial activity of extracts from *Cichorium intybus* root, *African Journal of Microbiology Research*, 5, 2353-2358.

Wang, W., Wu, X., Han, Y., Zhang, Y., Sun, T. & Dong, F. (2011). Investigation on ultrasound-assisted extraction of three dibenzylbutyrolactone lignans from *Hemistepta lyrata*.

Journal of Applied Pharmaceutical Science 1, 24-28.

Williams, J. T., Smith, R. W., Haq, N. & Dunsiger, Z. (2006). *Ber and other jujubes*. สืบค้นเมื่อ 11 มกราคม 2554 จาก http://www.icuc-iwmi.org/files/Publications/Ber_monograph.pdf.

Wolfe, K., Wu, X. & Liu, R. H. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels.

Agricultural and Food Chemistry, 51, 609-614.

Xue, Z. , Feng, W., Cao, J. , Cao, D. , Jiang, W. (2009). Antioxidant activity and total phenolic contents in peel and pulp of Chinese jujube (*Ziziphus jujube* mill) fruits, *Food*

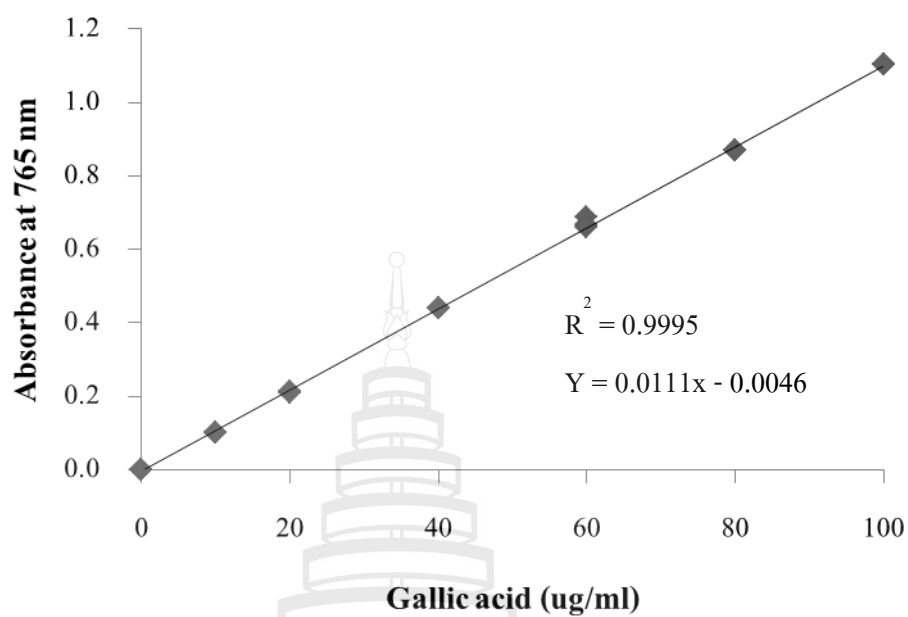
Biochemistry, 33, 613–629.

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

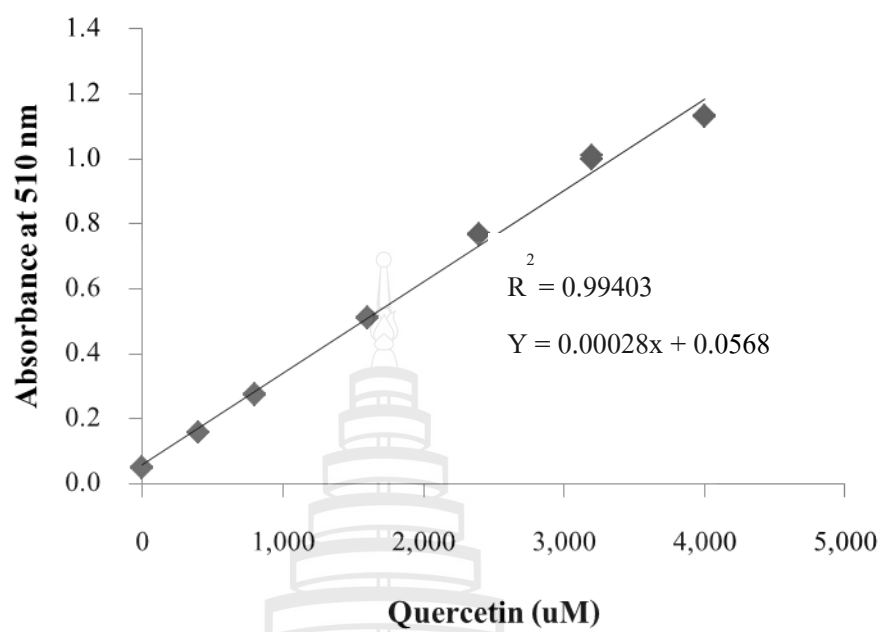
Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W., 1999, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64, 555-559.



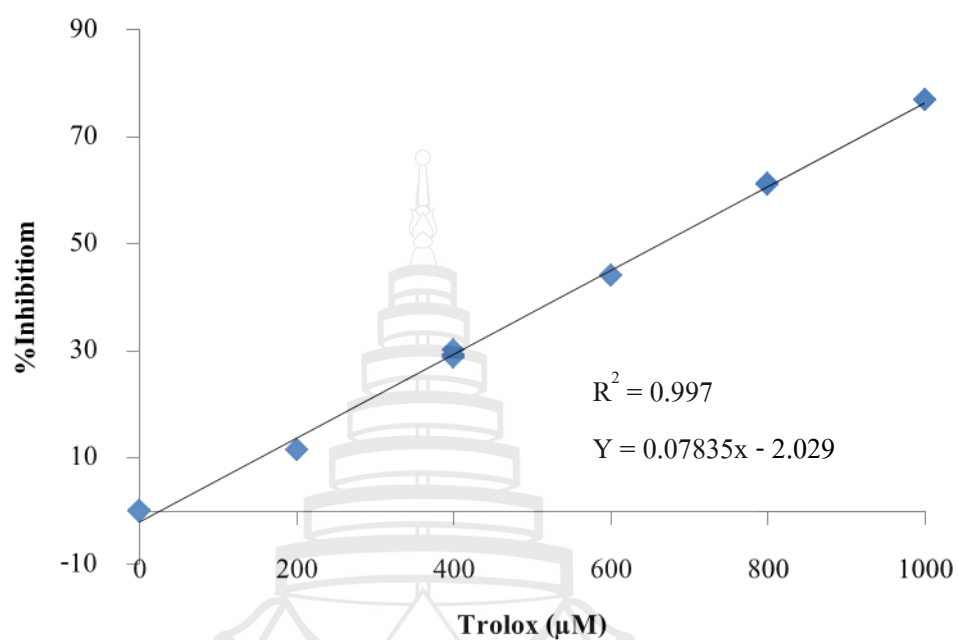
ภาคผนวก



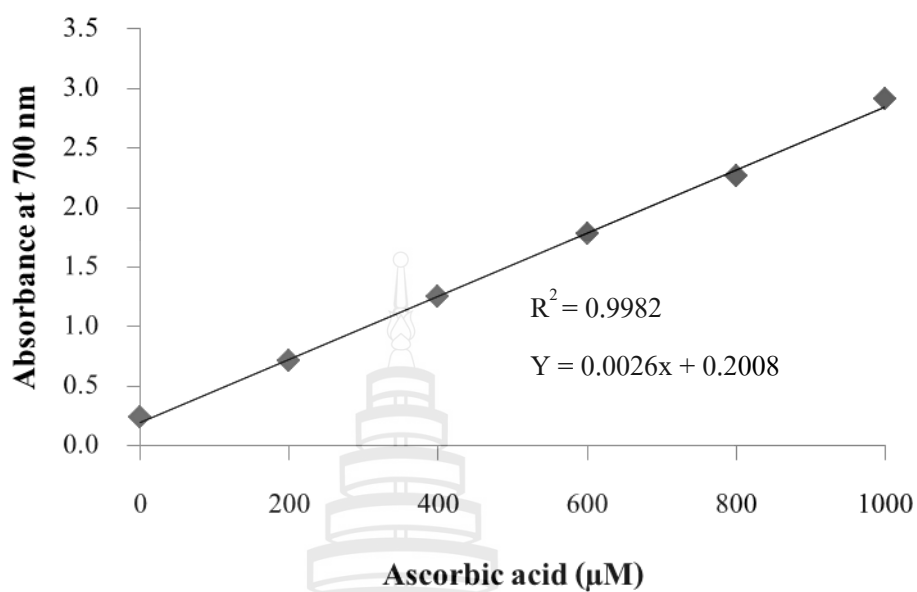
ภาพที่ ก1 A plot of gallic acid concentration *VS.* absorbance at 765 nm for total phenolic content determination



ภาพที่ ๓2 A plot of quercetin concentration *VS.* absorbance at 510 nm for total flavonoid content determination



ภาพที่ ๓3 A plot of trolox concentration *VS.* % inhibition for DPPH radical scavenging activity assay



ภาพที่ ๓4 A plot of ascorbic acid concentration *V/S.* absorbance at 700 nm for ferric reducing antioxidant power assay



ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววรินทร์ สารเชื่อนแก้ว

วัน เดือน ปีเกิด 1 มีนาคม 2530

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 141 หมู่ที่ 11 ตำบลร้องกวาง
อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่
54140

ประวัติการศึกษา
2553 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต
วิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลงานวิชาการ

- Sarnkhuankeaw, W., Theppakorn, T. & Punbusayakul, N. (2012). Effect of sonication time on bioactive compounds content in jujube (*Ziziphus jujuba* cv. Zimi) extract. *Journal of Agricultural Science*, 43, 377-380.
- Sarnkhuankeaw, W., Theppakorn, T. & Punbusayakul, N. (2012). Effect of extraction method to the antimicrobial activity of Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) in Chiang Rai Province. *Pure and Applied Chemistry International Conference*, 783 – 785.