



รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการ “การวิเคราะห์กรดไขมันโอเมก้าสาม และสารแอนตี้ออกซิแดนซ์ใน
ผักเบียร์ใหญ่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ”

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริธร ศิริอมรพรรณ และคณะ

25 พฤศจิกายน 2551

สัญญาเลขที่ MRG5080001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การวิเคราะห์กรดไขมันโอเมก้าสาม และสารแอนตี้ออกซิแดนท์ใน
ผักเบียร์ใหญ่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ”

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริธร ศิริอมรพรรณ	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. ไมตรี สุทธิจิตต์	มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea*) ถูกนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ รวมถึงการใช้เป็นยารักษาโรค แต่ในปัจจุบันมีการใช้ยาแผนปัจจุบันมากขึ้นทำให้การใช้ยาสมุนไพรลดน้อยลง ในการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ คือ ใบ ลำต้น และดอก โดยวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันและปริมาณไขมันและกรดไขมันชนิดต่างๆกรดไขมันจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ สกัดไขมัน โดยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1 v/v)และวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันโดยใช้เครื่อง Iatroscan องค์ประกอบของกรดไขมันวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค GLC เทียบกับสารมาตรฐาน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แอลฟาโทโคฟีรอล เบต้าแคโรทีน และวิตามินซี การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity, Hydroxyl radical scavenging activity, β -Carotene-linoleate bleaching assay, Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay, Total antioxidant capacity รวมถึงฤทธิ์การต้านไกลโคเจน และการต้านแบคทีเรีย การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์สารกลุ่มฟีนอลิกโดยใช้เทคนิค HPLC (DAD)

การวิจัยพบว่า องค์ประกอบของไขมันที่พบคือ Triacylglycerol ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมันที่พบมากที่สุดใใบและลำต้น มีค่าอยู่ในช่วง 17-67 เปอร์เซ็นต์ ไขมันชนิด Phytosterol (9-32 %) Phospholipids (10-67 %) และ Free fatty acid พบได้เฉพาะในส่วน ของใบ องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบมากคือ กลุ่มกรดไขมันชนิด PUFA ประกอบด้วยกรดไขมัน α -linolenic (18:3n-3) มีค่า 23-46 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ใบมีกรดไขมันในกลุ่ม PUFA มากที่สุด (61.18 %) รองลงมาคือดอก (59.04%) และลำต้น (41.96 %) กรดไขมัน linoleic (18:2n-6) มีประมาณ 26% ของกรดไขมันทั้งหมดของดอก จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบของไขมันและกรดไขมันในส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารประกอบฟีนอลิก อยู่ในช่วง และ 5.69 ถึง 24.12 GAE mg/100g ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งพบมากที่สุดใใบ เบต้าแคโรทีน และวิตามินซี มีปริมาณอยู่ในช่วง 29 ถึง 58 $\mu\text{g/g}$ และ 227 ถึง 399 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ ซึ่งพบมากที่สุดใใบ ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบมากที่สุดคือ gallic acid รองลงมาคือ catechin acid และ tannic acid การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่างๆมีความสามารถแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าดอกมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (IC_{50} 0.006 mg/ml) , Hydroxyl radical scavenging activity (IC_{50} 0.23 mg/ml) และ Total antioxidant capacity (37.99 mg/mg) ในขณะที่ใบ มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ด้วยวิธี β -carotene-linoleate bleaching assay (37.99 %)และ FRAP (0.49 $\mu\text{mol/g}$) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มากที่สุด ($R = 0.948$)

การทดสอบฤทธิ์การต้านไกลโคเจนจากส่วนต่างๆ พบว่าใบ มีความสามารถในการต้านฤทธิ์ไกลโคเจนมากที่สุด ($p < 0.05$) รองลงมาคือ ดอก และลำต้น

การศึกษาการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ ด้วยน้ำกลั่น ปลอดเชื้อ, เอทิลแอลกอฮอล์ 95%, เฮกเซน โดยทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Samonella typh* , *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* ตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibition concentration: MIC) และตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดของของเชื้อจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration: MBC) พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ที่สกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์ เฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิดที่ทำการศึกษาได้ จากผลการศึกษา สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในกระเพาะอาหารได้

โดยสรุปการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าผักเบี้ยใหญ่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญ คือเป็นแหล่งของกรดไขมันชนิดโอเมก้าสาม สารประกอบฟีนอลิก เบต้าแคโรทีน และวิตามินซี ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเกิดโรคเบาหวานหรือการต้านไกลโคเจน รวมทั้งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ในส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่มีความแตกต่างกัน

ABSTRACT

Purslane (*Portulaca oleracea*) has long been regarded as a food and medicinal plant. We investigated the fatty acid composition and other bioactive compounds of Thai purslane. Different purslane fractions were further examined for antioxidant, antiglycation and antimicrobial activities. In addition, the composition of phenolic acids and total phenolic content of Thai purslane were also determined. The water extract of leaf, stem and flower fractions were measured by several *in vitro* systems of assays, namely DPPH radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, β -Carotene–linoleate bleaching assay, ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay, total antioxidant capacity and identification phenol compounds by high performance liquid chromatography with the UV-Diode Array detection.

The results found that triacylglycerol was the most predominant lipid component, followed by phospholipid, phytosterol and free fatty acid respectively. For fatty acid composition, alpha-linolenic acid (18:3 n-3) was the most predominant fatty acid (23-46% of total fatty acid) and mostly found in leaf, followed by flower and stem.

The extracts of different fractions were found to have different levels of antioxidant activity in the systems tested. The leaf extract showed the highest value of antioxidant activity based on DPPH radical scavenging activity, ferric reducing, while the green flower extract showed the highest value of antioxidant activity based on hydroxyl radical scavenging activity, β -carotene–linoleate bleaching assay and total antioxidant capacity. The predominant phenolic compounds were gallic acid followed by caffeic acid and catechin. For testing of antimicrobial, we found that antibacterial activities of bitter melon different fractions were tested against five pathogenic bacteria. The fractions were extracted using 95% ethanol and hexane.

Antimicrobial activities of the extracts were determined by the minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) against five species of pathogenic bacteria including *Samonella typhi* , *Eschercihia coli* O157:H7, *Klebsiella Pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*. All bacteria tested in this study were found to be inhibited by the crude extracts of bitter gourd fractions. In conclusion, the results of this research could be applied to control gastrointestinal pathogenic microorganisms.

In conclusion, this research has demonstrated that Thai purslane could be considered as a good vegetable with high omega-3 fatty acid content, providing good antioxidant, antiglycation and antimicrobial activities.

Executive Summary

โครงการ “ การวิเคราะห์กรดไขมันโอเมก้าสาม และสารแอนติออกซิแดนท์ในผักเบี้ยใหญ่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ” มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ และองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดโอเมก้าสาม และกรดไขมันชนิดต่างๆจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ไทย ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ใบ ลำต้น และ ดอก โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH , Hydroxyl radical scavenging activity, FRAP, β -Carotene–linoleate bleaching และ Total antioxidant capacity รวมถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่นอกจากนี้ยังจำแนกชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดย HPLC/DAD จากการวิจัยพบว่า องค์ประกอบของกรดไขมันโอเมก้าสามที่จำเป็นต่อร่างกาย α -linolenic acid (18:3 n-3) ในใบสูงสุดประมาณ 46.13% การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสกัดจากดอกของผักเบี้ยให้มีความสามารถมากที่สุด โดยการศึกษาการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (IC_{50} 0.006 $\pm$ 0.54 mg/ml), Hydroxyl radical scavenging activity (IC_{50} 0.23 $\pm$ 0.05 mg/ml)และ Total antioxidant capacity (0.909 mg/mg)รวมทั้งมีปริมาณประกอบฟีนอลิกมากที่สุด สารสกัดจากลำต้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดด้วยวิธี β -Carotene–linoleate bleaching (22.67 $\pm$ 0.64) และสารสกัดจากใบมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดด้วยวิธี FRAP (0.497 mmol FeSO₄/100 g น้ำหนักแห้ง) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และการจำแนกสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้ HPLC/DAD โดยเบื้องต้นพบว่ามีสารฟีนอลิกที่พบคือ gallic acid, tannic acid, (+)-catechin จากการวิจัยเบื้องต้นดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่า ผักเบี้ยใหญ่มีศักยภาพในการเป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันโอเมก้าสามและมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์การต้านไกลโคเจนจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ พบว่าใบมีความสามารถในการต้านฤทธิ์ไกลโคเจนมากที่สุด (p<0.05) รองลงมาคือ ดอกและลำต้น

การศึกษาด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ, เอทิลแอลกอฮอล์ 95%, เฮกเซน โดยทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Samonella typh* , *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* ตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibition concentration: MIC) และตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดของของเชื้อจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration: MBC) พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ที่สกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์ เฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิดที่ทำการศึกษาได้ จากผลการศึกษา สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในกระเพาะอาหารได้

จากการวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าผักเบี้ยใหญ่ไทยเป็นพืชที่มีศักยภาพในการใช้เป็นผัก
บริโภค ที่ประกอบด้วยกรดไขมันโอเมก้าสาม มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ การต้านไกล
เคชั่น และการต้านแบคทีเรียเป็นอย่างดี

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
ขอบเขตการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ผักเบี้ยใหญ่	5
กรดไขมัน	7
อนุมูลอิสระ	17
สารต้านอนุมูลอิสระ	19
อาหารต้านอนุมูลอิสระ	20
การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	27
ไกลเคชั่น	30
ไกลเคชั่นกับโรคเบาหวาน	32
เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร	32
การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	40
3 วิธีดำเนินการวิจัย	42
แผนการวิจัย	42
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	43
วิธีดำเนินการวิจัย	45
สถิติที่ใช้ในการวิจัย	56

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	57
5 สรุป	79
บรรณานุกรม	81
ภาคผนวก	86
Output	87

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาณสารแอนต็อกซิแดนท์และกรดไขมันจำเป็นต่อร่างกายในผักเบียร์ใหญ่ และผักขม (เทียบกับ 100 กรัม น้ำหนักผักสด.....	7
2 ความสำคัญของกรดไขมันจำเป็น (EFAs).....	11
3 กรดไขมันชนิดต่างๆ	12
4 อนุมูลอิสระและสัญลักษณ์.....	18
5 ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ จากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่	58
6 ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ จากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่	58
7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันจากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่โดยใช้ เครื่อง latroscan (TLC/FID)	59
8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันจากส่วนต่างๆของคุณนายตีนทรายโดยใช้ เครื่อง latroscan (TLC/FID)	59
9 องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) จากส่วนต่างๆ ของผักเบียร์ใหญ่.....	61
10 องค์ประกอบของกรดไขมันจากส่วนต่างๆ ของคุณนายตีนทราย.....	62
11 ปริมาณความเข้มข้นของไขมันจากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่.....	64
12 ปริมาณความเข้มข้นของไขมัน จากส่วนต่างๆของคุณนายตีนทราย.....	65
13 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่	66
14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆของคุณนายตีนทราย	67
15 ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัม/ลิตร)ในส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่.....	68
16 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่.....	69
17 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ของ สารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่	70
18 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity ของ สารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่	71
19 การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β -Carotene-linoleate bleaching	72
20 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Total antioxidant capacity	74
21 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในวิธีที่แตกต่างกัน	74

22	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ที่สกัดด้วย น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ เอ็กเซน ที่สามารถ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้	77
23	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียจากการทดสอบสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของผักเป็ดใหญ่ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ เอ็กเซน ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้	77

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 ผักเบี้ยใหญ่และคุณนายตื่นสาย	6
2 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ (free radicals).....	19
3 โครงสร้างอนุพันธ์ของวิตามินอี ซึ่งจะแตกต่างกันในหมู่ methyl ตำแหน่งที่ 5 และตำแหน่งที่ 7	21
4 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน	22
5 โครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก	24
6 โครงสร้างของกลุ่มสารฟีนอลิก	26
7 โครงสร้างของสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	27
8 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระต่อ อนุมูล DPPH [•]	28
9 การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา Fenton reaction.....	28
10 การรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe ³⁺ -TPTZ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe ²⁺ -TPTZ	29
11 การเกิด Schiff base และ Amadori compound ในปฏิกิริยาไกลเคชั่น	31
12 ปฏิกิริยาไกลเคชั่น และกระบวนการเกิด AGEs	31
13 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย	55
14 ปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมันในผักเบี้ยใหญ่	60
15 ปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมันในคุณนายตื่นสาย.....	63
16 ปริมาณความเข้มข้นของไขมันจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่.....	65
17 ปริมาณความเข้มข้นของไขมันจากส่วนต่างๆของคุณนายตื่นสาย.....	66
18 อัตราการ Degradation ของผักเบี้ยใหญ่ด้วยวิธีβ-Carotene–linoleate bleaching	72
19 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	73
20 การเปรียบเทียบผลของการยับยั้งของสาร aminoguanidine และสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370/440 นาโนเมตร(excitation/emission)	75

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับบทบาทของกรดไขมันกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโอเมก้าสาม (omega-3; n-3) ที่สำคัญ ได้แก่ α -linolenic acid (ALA; 18:3 n-3), EPA (eicosapentaenoic acid) และ DHA (docosahexaenoic acid) เนื่องจากพบว่าสามารถลดอัตราเสี่ยงและป้องกันการเกิดโรคต่างๆมากมาย ที่สำคัญได้แก่ โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคไขข้ออักเสบ โรคมะเร็ง และโรคอ้วน เป็นต้น ส่งผลให้มีการนำเข้าสู่ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพที่มีโอเมก้าสามเป็นส่วนประกอบโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันปลา ที่ประกอบด้วยกรดไขมันโอเมก้าสามซึ่งมีโซยาว คือ EPA และ DHA นอกจากนี้ยังมีอาหารเสริมไขมันจากพืชออกมาจำหน่ายในรูปของน้ำมันลินิน (flaxseed oil, hemp seed oil) ผลิตภัณฑ์จากอเมริกา ยุโรปและออสเตรเลีย ซึ่งมีราคาแพงจากต่างประเทศ ทำให้ประเทศต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบริโภคอาหารเสริมเหล่านี้เป็นจำนวนมาก(รายงานกระทรวงพาณิชย์ 2546)

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเบื้องต้นและรายงานการศึกษาองค์ประกอบและปริมาณกรดไขมันที่สำคัญในเมล็ดพืชหลายชนิดพบว่าเมล็ดพืชที่พบในประเทศไทยที่มีปริมาณกรดไขมันโอเมก้าสามปริมาณสูงมาก ได้แก่ งามัธ (*Perilla frutescens*) ประกอบด้วย ALA 55-60% (Siriamornpun et al. 2005a) และบางชนิดประกอบด้วยกรดไขมันที่สำคัญและมีประโยชน์ เช่น กรดไขมันโอเมก้าหกที่สำคัญ คือ linoleic acid (18:2n-6) and oleic acid (18:1) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิเคราะห์กรดไขมันในในผักสีเขียวชนิดต่างๆ ที่นิยมบริโภคในประเทศไทยและผักป่าหลายชนิด พบว่า น้ำมันที่สกัดได้มีคุณภาพสูง (Siriamornpun et al. 2005b) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในต่างประเทศที่มีการศึกษาปริมาณกรดไขมันโอเมก้าสามในผัก เช่น ผักขม กะหล่ำปลี บร็อคโคลี่ พาสลีย์ และ สรระแห่น เป็นต้น (Pereiar et al. 2001) แต่ยังมีพืชอีกมากมายหลายชนิดที่ยังไม่มีการศึกษาหรือรายงานการวิจัย นอกจากนี้หากเราสามารถนำเอาพืชผักที่มีองค์ประกอบกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกายในแหล่งๆต่างมาใช้ทดแทนน้ำมันจากสัตว์ทะเล เช่น ปลาน้ำลึก จะทำให้ราคาถูกลง เพราะเนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพแต่ยังไม่มีการศึกษาแหล่งโอเมก้าสามกันอย่างจริงจัง และนอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณการผลิตได้ เป็นการส่งเสริมอาชีพการเกษตร และรายได้ให้กับเกษตรกรในประเทศได้อีกทางหนึ่ง และน้ำมันเสริมสุขภาพนี้ยังเป็นแหล่งสารอาหารไขมันที่สำคัญกับผู้บริโภคอีกด้วย

ผักเบียร์ใหญ่ (*Portulaca oleracea*) เป็นวัชพืชที่มีจำนวนสายพันธุ์มากกว่า 120 ชนิด เป็นวัชพืชที่พบมากเป็นอันดับ 8 ของโลก สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่ต้องอาศัย การดูแลมากนัก ผักเบียร์ใหญ่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์รวมถึงการใช้เป็นยารักษาโรค แต่ในปัจจุบันมีการใช้ยาแผนปัจจุบันมากขึ้นทำให้การใช้ยาสมุนไพรลดน้อยลง จากงานวิจัยต่างประเทศ เช่น ออสเตรเลียและยุโรปพบว่าผักเบียร์ใหญ่เป็นพืชที่มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ มีกรดไขมัน α -linolenic acid สูงมาก ถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งมากกว่าผักใบเขียวชนิดอื่นๆ α -linolenic acid (ALA) เป็นกรดไขมันชนิดโอเมก้าสามที่จัดเป็นกรดไขมันชนิด ที่จำเป็นต่อร่างกาย ซึ่งหมายถึงร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้มีหน้าที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาการและการป้องกันโรคต่างๆ เนื่องจาก ALA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้าสามชนิดหลายตำแหน่ง ได้แก่ EPA, Docosapentaenoic acid (DPA) และ DHA ซึ่งส่วนมากพบในปลาน้ำลึกและสัตว์ทะเล และได้มีรายงานว่า มีประโยชน์ต่อการป้องกันโรคต่างๆ

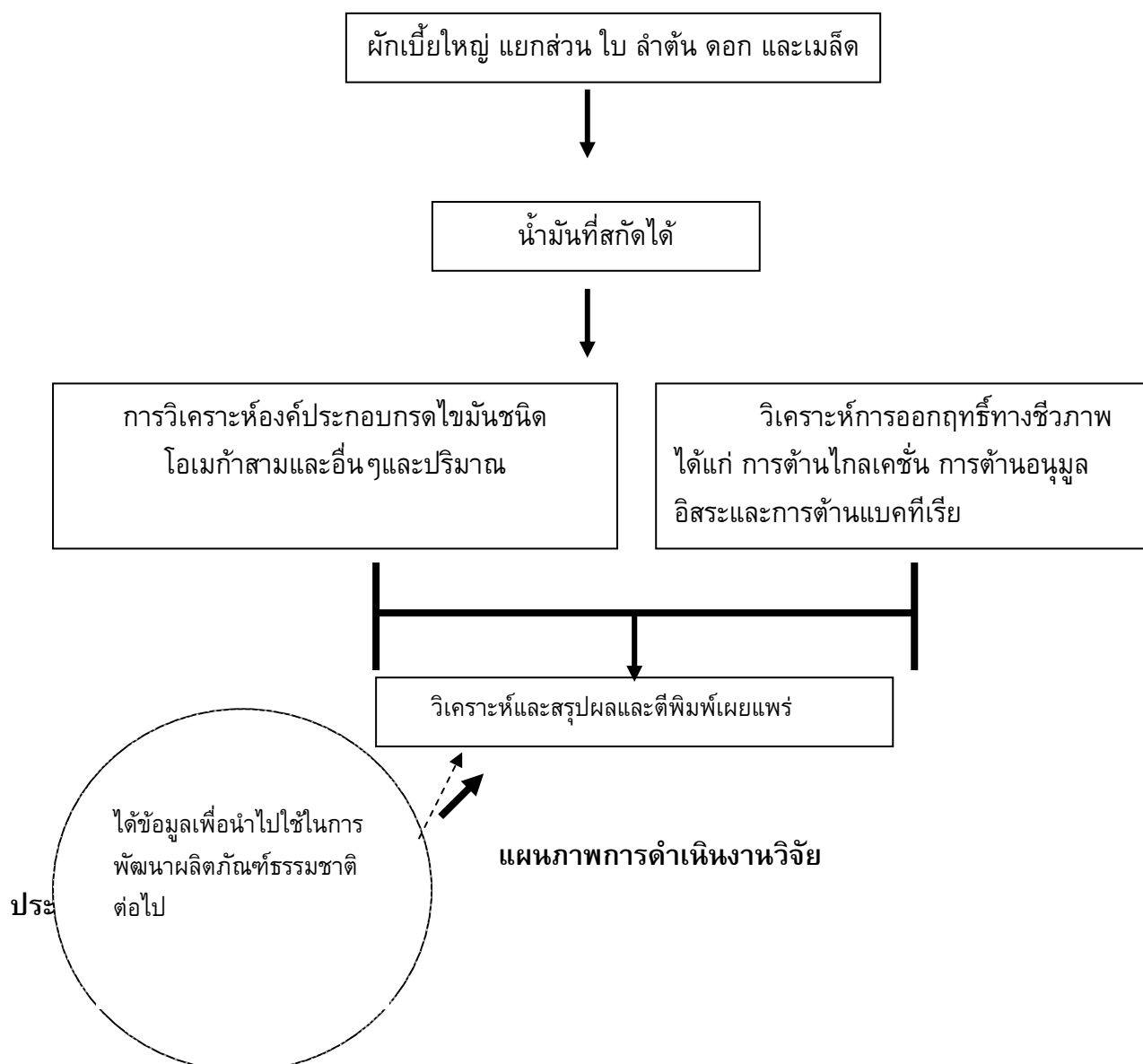
ผักเบียร์ใหญ่ได้ถูกตั้งชื่อว่าเป็นอาหารที่มีศักยภาพสูง “Power Food” เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารสูงและอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ วิตามิน เอ , ซี , อี และเบต้าแคโรทีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอันเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหัวใจ มะเร็ง และโรคติดเชื้อต่างๆ ในต่างประเทศเช่นออสเตรเลียมีการนำเอาผักเบียร์ใหญ่สายพันธุ์ออสเตรเลียมาใช้เป็นยารักษาโรค ในชนเผ่าพื้นเมือง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าชาวยุโรปได้นำมาบริโภคเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยมีรายงานการนำเอาผักเบียร์ใหญ่มาใช้เป็นยาสมุนไพรและรับประทานบ้างแต่ไม่มากนัก และจากรายงานวิจัยจนถึงปัจจุบันยังไม่มี การศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักเบียร์ใหญ่เลย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันชนิด โอเมก้าสามและแอนตีออกซิแดนท์ในผักเบียร์ใหญ่ใน ประเทศไทย รวมถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผักเบียร์ใหญ่เพื่อเป็นข้อมูลในการ พัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเสริมสุขภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดโอเมก้าสามและกรดไขมันชนิดต่างๆ จากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่ไทย ได้แก่ ใบ ลำต้น และ ดอก
2. วิเคราะห์สารแอนตีออกซิแดนท์ที่สำคัญในผักเบียร์ใหญ่ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน และวิตามินซี
3. ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผักเบียร์ใหญ่ ได้แก่ คุณสมบัติการต้านไกลเคชั่น คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติการต้านแบคทีเรีย

ขอบเขตการวิจัย

1. สกัดผักเบี้ยใหญ่สายพันธุ์ในท้องถิ่น 2 สายพันธุ์ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดย Gravimetric Method (Sinclair et al. 1992; Li, 1998)
2. วิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันชนิดโอเมก้าสามและกรดไขมันชนิดต่างๆ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีด้วยเครื่อง Gas liquid chromatography (GLC) (Sinclair et al. 1992; Li, 1998)
3. วิเคราะห์สารแอนตี้ออกซิแดนท์ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน และวิตามินซีโดยใช้เครื่อง HPLC (Liu et al. 2000)
4. ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง (*in vitro*) ดังนี้
 - 4.1 คุณสมบัติการต้านไกลเซชัน
 - 4.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ
 - 4.3 คุณสมบัติการต้านแบคทีเรีย



1. เกิดองค์ความรู้ใหม่ คือ ข้อมูลองค์ประกอบของกรดไขมันโอเมก้าสามและกรดไขมันที่จำเป็นชนิดต่าง ๆ รวมถึงสารแอนตี้ออกซิแดนท์ในผักเบียร์ใหญ่และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. สามารถนำองค์ความรู้ใหม่ไปใช้เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพหรือยาในอนาคต
3. เกิดผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ ซึ่งคาดว่าจะพิมพ์ 2 เรื่อง ดังนี้
 1. ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Antioxidant activities of Thai purslane (*Portulaca oleracea*) leaf, stem and flower fractions extract *in vitro*
ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Food Chemistry. (Impact factor 3.025)
 2. ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Omega-3 fatty acid content, antioxidant and antiglycation activities of Thai purslane
ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition (Impact factor 1.105)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งแบ่งได้เป็นหัวข้อต่อไปนี้

1. ผักเบี้ยใหญ่
2. กรดไขมัน
3. อนุมูลอิสระ
4. สารต้านอนุมูลอิสระ
5. อาหารต้านอนุมูลอิสระ
6. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
7. ไกลโคเจน
8. ไกลโคเจนกับโรคเบาหวาน
9. เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร
10. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

1. ผักเบี้ยใหญ่

ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea* Linn.) หรือ ผักตาไค้ หรือชื่อสามัญว่า Common Purslane ผักเบี้ยใหญ่หรือผักตาไค้เป็นพืชล้มลุกลำต้นเตี้ยแผ่ไปตามพื้นดินยาว ประมาณ 30 เซนติเมตร ลำต้นอวบน้ำเรียบสีม่วงแดงใบเดี่ยวปลายมนไม่เห็นเส้นใบเพราะใบหนาอวบน้ำใบออกตามข้อๆ ดอกตลอดปีทนทานต่อ ความแห้งแล้ง มีสรรพคุณแก้ไอแห้ง แก้เจ็บคอ แก้ขัดเบา แก้แผลอักเสบวม (กองพฤกษศาสตร์ราชพฤกษ์ <http://www.doa.go.th/botany/portole.html>)



ภาพ 1 ผักเบี้ยใหญ่และคุณนายตื่นสาย

ผักเบี้ยใหญ่ เป็นวัชพืชที่มีจำนวนสายพันธุ์มากกว่า 120 ชนิด เป็นวัชพืชที่พบมากเป็นอันดับ 8 ของโลก สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่ต้องอาศัยการดูแลมากนัก ผักเบี้ยใหญ่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์รวมถึงการใช้เป็นยารักษาโรค (Obied et al. 2003) แต่ในปัจจุบันมีการใช้ยาแผนปัจจุบันมากขึ้นทำให้การใช้ยาสมุนไพรลดน้อยลง จากงานวิจัยต่างประเทศ เช่น ออสเตรเลียและยุโรปพบว่าผักเบี้ยใหญ่เป็นพืชที่มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ มีกรดไขมัน α -linolenic acid สูงมาก ถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งมากกว่าผักใบเขียวชนิดอื่นๆ (Liu et al. 2000; Simopoulos et al. 1992) α -linolenic acid (ALA) เป็นกรดไขมันชนิดโอเมก้าสามที่จัดเป็นกรดไขมันชนิดที่จำเป็นต่อร่างกาย ซึ่งหมายถึงร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้มีหน้าที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการและการป้องกันโรคต่างๆ เนื่องจาก ALA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้าสามชนิดหลายตำแหน่ง ได้แก่ EPA, Docosapentaenoic acid (DPA) และ DHA ซึ่งส่วนมากพบในปลาน้ำลึกและสัตว์ทะเล และได้มีรายงานว่า มีประโยชน์ต่อการป้องกันโรคต่างๆ

ผักเบียร์ใหญ่ได้ถูกตั้งชื่อว่าเป็นอาหารที่มีศักยภาพสูง “Power Food” เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารสูงและอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ วิตามิน เอ , ซี , อี และเบต้าแคโรทีน (Liu et al. 2000; Simopoulos et al. 1992) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอันเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหัวใจ มะเร็ง และโรคติดเชื้อต่างๆ ดังแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารแอนตี้ออกซิแดนท์และกรดไขมันจำเป็นต่อร่างกายในผักเบียร์ใหญ่ และผักขม (เทียบกับ 100 กรัม น้ำหนักผักสด)

	ผักขม(spinach)	Chamber –Grow Purslane (mg/100 g fresh weight)	Wild purslane
Alpha-tocopherol	2	12	8
Beta-Carotene	3	2	2
Ascorbic acid	22	27	23
α -linolenic acid	48	341	322
Linoleic acid	10	97	70

ที่มา: Lorgieril and Salen, 2004

ในต่างประเทศเช่นออสเตรเลียมีการนำเอาผักเบียร์ใหญ่สายพันธุ์ออสเตรเลียมาใช้เป็นยารักษาโรคในชนเผ่าพื้นเมือง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าชาวยุโรปได้นำมาบริโภคเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพ

2. กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่พบในไขมันอย่างง่าย และไขมันเชิงประกอบ กรดไขมันทุกตัวประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน สูตรโดยทั่วไปของกรดไขมัน คือ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ซึ่ง n มีค่าตั้งแต่ 2-24 โดยทั่วไปคาร์บอนอะตอม มักเป็นเลขคู่คือตั้งแต่ 2 ขึ้นไป เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) หรือกรดน้ำส้ม (CH_3COOH) เป็นกรดไขมันที่โมเลกุลเล็กที่สุด ตามปกติจะไม่พบกรดไขมันอิสระในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะพบอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์รวมกับไขมันชนิดอื่น กรดไขมันจะแตกต่างกัน 2 ประการคือ ความยาวของห่วงโซ่คาร์บอนและขนาดของความอ้วนตัว

2.1 ประเภทของกรดแบ่งตามความยาวของห่วงโซ่คาร์บอน สามารถแบ่งกรดไขมันได้เป็น 3 กลุ่ม

2.1.1 กรดไขมันห่วงโซ่สั้น (short chain fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 6 ตัว หรือน้อยกว่า

2.1.2 กรดไขมันห่วง4. โซชนาดกลาง (medium chain fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 8 - 12 ตัว

2.1.3 กรดไขมันห่วง7. โซชนาดยาว (long chain fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 14 - 20 ตัว

ไขมันส่วนมากในอาหารจะประกอบด้วยกรดไขมันห่วงโซชนาดยาว ซึ่งความยาวของโซ่นี้ มีอิทธิพลต่อความสามารถของไขมันในการละลายน้ำ โดยที่กรดไขมันห่วงโซชนาดยาวซึ่งพบในอาหารทั่วไป จะไม่ละลายในน้ำ ไขมันห่วงโซชนาดสั้นและขนาดกลางจะสามารถละลายในน้ำ เช่น ไขมันในไข่แดงและนม

ขนาดความอึดตัวของไขมัน มีบทบาทสำคัญกับลักษณะทางกายภาพ ไขมันที่อึดตัวโดยมากจะมีห่วงโซชนาดยาว จึงมีสภาพเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เช่น ไขมันหมู ไขมันวัว ในขณะที่ไขมันไม่อึดตัวสูงและมักมีห่วงโซชนาดกลางจะอยู่ในสภาพของเหลว เช่น น้ำมันปลา น้ำมันมะกอก เป็นต้น

2.2 กรดไขมันแบ่งออกตามความอึดตัว (degree of saturation) สามารถแบ่งออก 2 ประเภท คือ

2.2.1 กรดไขมันอึดตัว (saturated fatty acid) หมายถึงกรดไขมันที่มีคาร์บอนในโมเลกุล มีไฮโดรเจนจับเกาะอยู่เต็มที่แล้วไม่สามารถรับไฮโดรเจนเข้าไปในโมเลกุลได้อีก แขนของคาร์บอน จะเป็นแขนเดี่ยวส่วนมากจะอยู่ในสภาพของไขมันซึ่งแข็งง่ายเมื่อถูกความเย็นเพียงเล็กน้อย กรดไขมันพวกที่อึดตัวนี้ มีสูตรทั่วไป คือ $C_nH_{2n}O_2$ ($n=4,6,8$) กรดไขมันที่จัดเป็นกรดไขมันอึดตัว เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก เป็นต้น

ไขมันของสัตว์บกจะมีกรดไขมันอึดตัวมากกว่าไขมันที่มาจากอาหารพวกพืชและปลา ยกเว้นน้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีกรดไขมันอึดตัวในปริมาณที่มาก กรดพาลมิติก เป็นกรดไขมันอึดตัวที่พบมากที่สุด ในธรรมชาติ โดยกระจายอยู่ทั่วไปในไขมันทุกชนิดประมาณร้อยละ 10 ถึง 50 ของกรดไขมันที่มีอยู่ทั้งหมด กรดไขมันที่อึดตัวชนิดอื่นที่พบมากรองลงมาได้แก่ กรดไมริสติก และกรดสเตียริก

2.2.2 กรดไขมันไม่อึดตัว (unsaturated fatty acid) หมายถึงกรดไขมันที่มีคาร์บอนในโมเลกุล มีไฮโดรเจนที่จับเกาะไม่เต็มที่ สามารถรับไฮโดรเจนเข้าไปในโมเลกุลได้อีก แขนของคาร์บอนมีทั้งแขนเดี่ยวและแขนคู่ ส่วนมากจะอยู่ในสภาพของน้ำมัน ซึ่งเป็นของเหลว กรดไขมันไม่อึดตัวนี้มักเกิดการออกซิเดชันขึ้นได้ง่าย เมื่อถูกออกซิไดส์จะทำให้เกิดการหืน ซึ่งทำให้รสและกลิ่นผิดไป นอกจากนี้ทำให้วิตามินที่ละลายในไขมันเสียไปด้วย คือ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค กรดไขมันไม่อึดตัวนี้ มีสูตรทั่วไป คือ $C_nH_{2n-2}O_2$ หรือ $C_nH_{2n-4}O_2$ กรดไขมันไม่อึดตัวนี้พบมากในน้ำมันพืช น้ำมันปลา และสัตว์ทะเลทั่วไป กรดไขมันไม่อึดตัวแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.2.2.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง (monounsaturated fatty acid ; MUFA) คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีแขนคู่ (double bound) เพียง 1 แห่ง ในสูตรโครงสร้าง เช่น กรดโอเลอิก (oleic acid) กรดพาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) กรดวาคซีนิก (vaccenic acid)

2.2.2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid ; FUFA) คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีแขนคู่ตั้งแต่ 2 แห่งขึ้นไป เช่นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้าสาม และกรดไขมันกลุ่มโอเมก้าหก กรดไขมันกลุ่มโอเมก้าหก ที่สำคัญได้แก่ กรดไลโนเลอิก (linoleic acid, LA) และกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid, AA) ส่วนกรดไขมันกลุ่มโอเมก้าสาม ได้แก่ กรดไลโนเลนิก (alpha-linolenic acid, LNA) ในปัจจุบันกรดไขมันกลุ่มโอเมก้าสาม ที่มีความสำคัญ และเป็นที่น่าสนใจของนักวิทยาศาสตร์ มี 2 ชนิด คือ กรดไอโคซาเพนตะอีโนอิก (eicosapentaenoic acid, EPA) และกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (docosahexaenoic acid, HDA)

2.3 การแบ่งประเภทกรดไขมันตามความต้องการของร่างกาย

กรดไขมันเมื่อแบ่งออกตามความต้องการของร่างกาย แบ่งได้ 2 ประเภทคือ

2.3.1 กรดไขมันจำเป็น (Essential Fatty Acid, EFA) กรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย หมายถึง กรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ จำเป็นต้องได้รับเข้าไปจากอาหารที่บริโภค ซึ่งได้แก่ไขมันไม่อิ่มตัว 2 ชนิด คือ linoleic acid (LA ; 18 : 2n-6) และ α -linolenic acid (ALA ; 18 : 3n-3) กรดทั้ง 2 ชนิดจึงเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อสุขภาพ ประกอบมาก พบมากในเนื้อเยื่อพืชและเมล็ดพืชน้ำมัน (Li and others. 2003 : 225-262 ; Siriamornpun and others. 2005 : 162) เป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของร่างกายและยังเป็นกรดไขมันตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน โซยาวที่สำคัญชนิดอื่นอีกด้วย (Simopoulos. 2003 : 405-412) กรดไขมันจำเป็นทั้ง 2 ตระกูลนี้ เมื่อร่างกายได้รับเข้าไปสามารถนำไปสร้างเป็นกรดไขมันอื่นๆ และสารที่มีความสำคัญต่อร่างกาย โดยไม่มีการสร้างทดแทนข้ามตระกูลกัน กล่าวคือ กรดไลโนเลอิกนำไปสร้างกรดไดโฮโมแกมมาไลโนเลนิก (dihomo gamma-linolenic acid ; 20 : 3 n-6) กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid ; 20:4 n-6) และกรดแอดเรนิก (adrenic acid; 22: 5 n-6) ส่วนกรดไขมันไลโนเลนิกนำไปสร้างกรด ไอโคซาเพนตะอีโนอิก (eicosapentaenoic acid; 20 : 5 n-3) หรือ EPA กรดโดโคซาเพนตะอีโนอิก (docosapntaenoic acid; 22 : 5 n-3) หรือ DPA และกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (docosahexaenoic acid ; 22:6 n-3) หรือ DHA

2.3.2 กรดไขมันไม่จำเป็น (nonessential fatty acid) คือ กรดไขมันที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นได้เอง เช่น กรดพาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) และกรดโอเลอิก (oleic acid) พบมากที่สุดในไขมันสัตว์และน้ำมันมะพร้าว ซึ่งจะเพิ่มโคเลสเตอรอลก่อให้เกิดเส้นเลือดตีบ

(ศิริธร ศิริอมรพรรณ. 2548 : 142) โดยกรดไขมันชนิดนี้จะสังเคราะห์จาก CoA เอสเตอร์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ตับ และเนื้อเยื่อไขมัน

2.4 กรดไขมัน โมก้าสาม และ โอเมก้าหก

กรดไขมันโอเมก้าสาม ที่สำคัญได้แก่ α -linolenic acid (ALA ; 18 : 3n-3) docosahexaenoic acid (DHA ; 22: 6n-3) eicosapentaenoic acid (EPA; 20: 5n-3) และ docosapentaenoic acid (DPA ; 22:5n-3) โดย ALA เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายพบมาก ในน้ำมันจากผักและเมล็ดพืชบางชนิด ส่วน EPA และ DHA พบมากในปลา น้ำมันปลาและสัตว์ทะเลทั่วไป ส่วน DPA จะพบส่วนใหญ่ในปลา เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Sinclair and others. 1992 : 77-83 ; Sinclair and others. 1998 : 116-120) ซึ่งมีรายงานวิจัยพบว่า กรดไขมัน ชนิดโอเมก้าสามมีความสำคัญต่อร่างกาย เช่นสามารถป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดตีบตัน เป็นต้น (Young. 2003 : 1-24 ; Simopoulos. 2003 : 405-412)

กรดไขมันโอเมก้าหก (n-6) มีหลายชนิด ส่วนใหญ่ได้จากการเผาผลาญในอาหารที่มาจากน้ำมันพืช ประกอบด้วย linoleic acid (LA), γ -linoleic acid (GLA), dihomogamma-linoleic acid (DGLA) และกรดไขมัน arachidonic (AA) สามารถที่จะเผาผลาญจากอาหารพวกเนื้อ และ GLA สามารถดูดซึมจากน้ำมันพืชทั่วไป เช่น น้ำมันดอกพริมโรส borage oil และน้ำมันจากองุ่นดำ กรดไขมันทั้งสองกลุ่มนี้มีบทบาททางโภชนาการอาหารต่อร่างกายคนเราอย่างมาก ตัวอย่างเช่นเป็นตัวกำหนดให้เกิดอัตราการเกิดออกซิเดชัน อัตราการเผาผลาญพลังงานและการสร้างพลังงาน นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยที่ช่วยรักษาอุณหภูมิของร่างกาย แยกโสตประสาท และป้องกันการกระทบกระเทือน ของเนื้อเยื่อของร่างกาย (Sinclair and others. 1998 : 116-120)

2.5 ความสำคัญของกรดไขมัน โอเมก้าสามและโอเมก้าหก

กลุ่มของกรดไขมันจำเป็นทั้ง 2 ชนิด คือ โอเมก้าสาม (n-3) และโอเมก้าหก (n-6) กรดไขมันโอเมก้าสาม ประกอบด้วย α -linolenic acid (LNA) eicosapentanoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) กรดไขมันโอเมก้าสาม (n-3) พบมากในอาหารประเภทปลา และสัตว์ทะเลน้ำลึกที่กินแพลงตอนและสาหร่ายที่เป็นอาหาร ปัจจุบันกรดไขมันโอเมก้าสาม เป็นที่ยอมรับในทางการแพทย์ว่าสามารถรักษาอาการของโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดและโรคหลอดเลือดแดงแข็งและตีบได้ นอกจากนี้ DHA ยังมีความจำเป็นต่อการพัฒนาระบบสมอง ระบบการมองเห็น รวมทั้งระบบสืบพันธุ์ของทารกในครรภ์มารดา โดยเฉพาะในระยะ 3 เดือนสุดท้าย ก่อนคลอดไปถึง 2 ขวบ ซึ่งหากทารกขาดกรดไขมันนี้ จะทำให้การพัฒนาของระบบดังกล่าวผิดปกติได้ ในขณะเดียวกัน โอเมก้าสามยังทำหน้าที่สร้างระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายด้วย โดยที่แพทย์แนะนำให้บริโภคไขมันโอเมก้าสาม ปริมาณ 1,000 มิลลิกรัม/วัน เป็นการป้องกันการอุดตันของหลอดเลือด และโรคหัวใจ (Sinclair and others. 1998 : 116-120)

กรดไขมันโอเมก้าหก (n-6) มีหลายชนิด ส่วนใหญ่ได้จากการเผาผลาญในอาหารที่มาจากน้ำมันพืช ประกอบด้วย linoleic acid (LA), γ -linoleic acid (GLA), dihomogamma-

linoleic acid (DGLA) และ arachidonic acid (AA) นอกจากนี้ยังพบว่า AA สามารถที่จะเผาผลาญจากอาหารพวกเนื้อ และ GLA สามารถดูดซึมจากน้ำมันพืชทั่วไป เช่น น้ำมันดอก primrose, borage oil และน้ำมันจากองุ่นดำ (Simopoulos. 2003 : 405-412)

กรดไขมันทั้งสองกลุ่มนี้มีบทบาททางโภชนาการอาหารต่อร่างกายคนเราอย่างมาก ตัวอย่างเช่น เป็นตัวกำหนดให้เกิดอัตราการเกิดออกซิเดชัน อัตราการเผาผลาญพลังงานและการสร้างพลังงาน นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยที่ช่วยรักษาอุณหภูมิของร่างกาย แยกโสตประสาท และป้องกัน การกระทบกระเทือนของเนื้อเยื่อของร่างกาย (Li and others. 2003 : 225-262)

ตารางที่ 2 ความสำคัญของกรดไขมันจำเป็น (EFAs)

กรดไขมัน	ชนิด	อาหารที่มี	ประโยชน์
ไลโนเลอิก(LA)	โอเมก้าหก เป็นกรดไขมันหลัก	น้ำมันพืชรวมถึงน้ำมันมะกอก เมล็ดพืช ถั่วต่างๆ	บำรุงผิว ส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็น GLA ได้ ผลิตไอโคซานอยด์ ซึ่งสำคัญต่อสุขภาพประกอบประจำวัน
แกมมา-ไลโนอิก (GLA)	โอเมก้าหก	น้ำมันบorage พรหมโรส	ในขณะที่ AA ในจำนวนเล็กน้อยจำเป็นสำหรับพัฒนาการของทารกในครรภ์ แต่ก็ไม่แนะนำให้รับประทานเสริม
อะราซิโดนิก (AA)	โอเมก้าหก	เนื้อ, ไข่	ได้รับมากเกินไปจะเกิดผลร้าย ไม่แนะนำให้ใช้เป็นอาหารเสริม
อัลฟา-ไลโนเลอิก (LNA)	โอเมก้าสามเป็นกรดไขมันหลัก	ผักใบเขียว น้ำมันเมล็ดแฟลกซ์ น้ำมันเบลิคเคอเรนท์ น้ำมันคาโนล่า, วอลนัทและบราซิลนัท	สุขภาพประกอบของหัวใจ การทำงานของภูมิคุ้มกัน ป้องกันมะเร็งและอัมพฤกษ์ สามารถเปลี่ยนเป็น EPA และ
ไอโคซาเพนตาอีโนอิก(EPA)และโดโคซาเฮกซาอีโนอิก(DHA)	โอเมก้าสาม	ปลาที่มีไขมัน เช่น ทูน่า แซลมอน แมคเคอเรล เฮอริงไวท์ฟิช ไข่ที่ได้รับโอเมก้าสาม เพิ่มเข้าไป	DHA ผลิตไอโคซานอยด์ สุขภาพประกอบของหัวใจ ป้องกันมะเร็ง และพัฒนาสมอง/การมองเห็นของทารก

ตารางที่ 3 กรดไขมันชนิดต่างๆ

ชื่อสามัญ	Δ AND ω CODING NAME	ชื่อวิทยาศาสตร์
SATRRATES		
Myristic acid	14:0	Tetradecanoic acid
Pentadecanoic acid	15:0	Pentadecanoic acid
Palmitic acid	16:0	Hexadecanoic acid
Margaric acid	17:0	Heptadecanoic acid
Stearic acid	18:0	Octadecanoic acid
Arachidic acid	20:0	Eicosenoic acid
Behenic acid	22:0	Docosanoic acid
Lignoceric acid	24:0	Tetracosanoic acid
Δ^9 DESATURASE FAMILY		
Myristoleic acid	14:1 n-5	9-tetradecanoic acid
	15:1n-9	Pentadecenoic acid
Palmitoleic acid	16:1n-7	9-hexadecenoic acid
	17:1n-9	Heptadecenoic acid
Vaccenic acid	18:1n-7	11-octadecenoic acid
Oleic acid	18:1n-9	9-octadenoic acid
Eicosenoic acid	20:1n-9	11-eicosenoic acid
Mead acid	20:3n-9	5,8,11-eicosatrienoic acid
OMEGA 3 FAMILY		
Erucic acid	22:1n-9	13-docosanoic acid
Nervonic acid	24:1n-9	15-tetracosanoic acid
Alpha-linolenic acid	18:3n-3	9,12,15-octadecatrienoic acid
Stearidonic acid	18:4n-3	6,9,12,15-octadecatetraenoic acid
Eicosatrienoic acid (ETA)	20:3n-3	11,14,17-eicosatrienoic acid
Eicsoatetraenoic acid	20:4n-3	8,11,14,17-eicsoatetraenoic acid
Eicosapentaenoic acid (EPA)	20:5n-3	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid

ตาราง 3 (ต่อ)

OMEGA 3 FAMILY		
Docosapentaenoic acid (DPA)	22:5n-3	7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid
Docosahexaenoic acid (DHA)	22:6n-3	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid
Tetracosahexaenoic acid	24:6n-3	6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoic acid
OMEGA 6 FAMILY		
Linoleic acid	18:2n-6	9,12-octadecadienoic acid
Gamma-linolenic acid	18:3n-6	6,9,12-octadecatrienoic acid
Eicosadienoic acid	20:2n-6	11,14-eicosadienoic acid
Homo- α -linolenic acid	20:3n-6	8,11,14-eicosatrienoic acid
Arachidonic acid	20:4n-6	5,8,11,14-eicosatetraenoic acid
Docosadienoic acid	22:2n-6	13,16-docosadienoic acid
Adrenic acid	22:4n-6	7,10,13,16-docosatetraenoic acid
Docosapentaenoic acid	22:5n-6	4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid

2.6 ชนิดของไขมันในอาหาร

ไขมันของอาหารแบ่งตามชนิดของกรดไขมันได้ 3 ชนิด ใหญ่ๆ คือ

1. Saturated fats
2. Monosaturated fats
3. Polyunsaturated fats

ในปัจจุบันได้มีการแนะนำให้มีการบริโภคไขมันไม่เกิน 30% ของพลังงานทั้งหมดให้เป็น saturated < 8%, linoleic acid > 2%, alpha-linolenic acid > 1%, EPA > 0.1%, DHA > 0.1% ของพลังงานทั้งหมด และให้พลังงานที่เหลือมาจากกรดไขมันชนิด monounsaturated fatty acids (Simopoulos, Leaf and Salem, 2000)

2.7 ประเภทของไขมันไขมันสามารถแบ่งประเภทออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

2.7.1 ไขมันธรรมดา (simple lipids) คือ เอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์นั้น คือ กลีเซอรอล จะได้สารประกอบไขมันหรือน้ำมัน พบในไขมันจากพืชและสัตว์ แต่ถ้าแอลกอฮอล์เป็นพวกอื่น ไม่ใช่กลีเซอรอลจะได้ไข (waxes) เช่น ไขจากผึ้ง ตามปกติไขมันและน้ำมันที่พบโดยทั่วไปจะมีอยู่ 3 รูป คือ

2.7.2 โมโนกลีเซไรด์ (monoglyceride) เป็นไขมันหรือน้ำมันที่เกิดจากกลีเซอรอล 1 โมเลกุล รวมกับกรดไขมัน 1 โมเลกุล

2.7.3 ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) เป็นไขมันหรือน้ำมันที่เกิดจาก กลีเซอรอล 1 โมเลกุล รวมกับกรดไขมัน 2 โมเลกุล

2.7.4 ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เป็นไขมันหรือน้ำมันที่เกิดจาก กลีเซอรอล 1 โมเลกุล รวมกับกรดไขมัน 3 โมเลกุล เป็นรูปของไขมันที่มนุษย์บริโภคมากที่สุด

2.8 ไขมันเชิงประกอบ (compound lipids) คือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน และแอลกอฮอล์ และมีสารประกอบอื่นรวมอยู่ด้วย เช่น คาร์โบไฮเดรต ฟอสเฟต หรือสารประกอบพวกไนโตรเจน ไขมันเชิงประกอบที่สำคัญในโภชนาการมนุษย์ ได้แก่

2.8.1 ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เป็นสารประกอบของไขมันธรรมดาที่มีหมู่ ฟอสเฟตและสารประกอบไนโตรเจน เช่น เลซิธิน (lecithin) ในไข่แดง เซฟาลิน (cephalin) และสฟิงโกมายเอลิน (sphingomyelin) ในสมอง

2.8.2 ไกลโคลิปิด (glycolipid) เป็นสารที่มีคาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาล กลูโคส หรือกาแลคโตสรวมอยู่ นอกเหนือจากกรดไขมันและไนโตรเจน พบส่วนใหญ่ในเนื้อเยื่อสมอง ดังนั้นส่วนมากจึงเรียกระบบนี้ว่าซีรีโบไซด์ (cerebrosides)

2.8.3 ไลโปโปรตีน (lipoprotein) หมายถึง ไขมันที่มีโปรตีนรวมอยู่ในโมเลกุล พบในน้ำเลือดทำหน้าที่ขนส่งไขมันทั้งหลายไปยังส่วนต่างๆของเซลล์ทั่วร่างกาย

2.9 อนุพันธ์ไขมัน (derivative lipids) คือไขมัน ที่ได้จากการแตกตัวของไขมันอย่างง่าย หรือ ไขมันเชิงประกอบไขมันพวกนี้ได้แก่

ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) มีในเซลล์พืชและสัตว์ทุกชนิด มีปริมาณมากเป็นที่ 2 รองจากกรดไขมันเป็นสารจำเป็นสำหรับเซลล์และเป็นสารไขมันรูปหนึ่งที่เก็บสะสมไว้ในร่างกาย ที่สำคัญๆ ได้แก่ เซฟาลิน (saphalin) สฟิงโกมายเอลิน (sphingomyelin) เลซิธิน (lecithin) โคลีน (colin) ฟอสโฟลิปิด ไขมันนี้มักพบอยู่รวมกันหลายชนิดในอวัยวะต่างๆ ในอัตราส่วนแตกต่างกัน จัดว่าเป็นไขมันที่มีความสำคัญมากโดย

1. เป็นโครงสร้าง (รวมกับโปรตีน) ของผนังเซลล์และเซลล์ออร์แกเนลล์ เป็นที่ให้โปรตีนและส่วนของโปรตีนเอนไซม์ยึดติดให้ถูกแบบและควบคุมเกี่ยวกับความปกติของเซลล์มากกว่าที่จะเป็นไขมันที่สะสม

2. จำเป็นสำหรับการย่อยการดูดซึมและการขนส่งสารอาหารจำพวกไขมัน และช่วยให้เซลล์สามารถนำกรดไขมันไปใช้ได้เร็วขึ้น เพราะฟอสโฟลิปิดเป็นไขมันที่รวมกับน้ำได้ดีกว่าไขมันประเภทอื่น โดยที่ส่วนที่เป็นฟอสฟอรัสในโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดจะจับกับน้ำ และส่วนที่เป็นไขมันจะจับกับไขมันตัวอื่น ดังนั้นจึงช่วยขนส่งไขมันภายในร่างกาย

3. เป็นส่วนประกอบของเลือด โดยรวมกับโปรตีนในอัตราส่วนต่างๆ กัน ทำหน้าที่ในการขนส่งสารอาหารที่เป็นไขมันต่างๆไปยังเซลล์ ระดับฟอสโฟลิปิดในเลือดของคนปกติอายุ

20-50 ปี จะประมาณ 250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ฟอสโฟลิปิดจะถูกสร้างขึ้นและถูกทำลายในตับ และจะไม่ถูกส่งไปยังเซลล์ของเนื้อเยื่ออื่นๆ เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิด สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดสำหรับใช้เองได้

4. ช่วยหล่อลื่นพื้นผิว เช่น เคลือบด้านมนของถุงลมปอด ทำให้ผนังของถุงลมไม่ติดกันขณะหายใจ

คอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารอาหารประเภทไขมันที่มีสูตรโครงสร้างเป็นสเตอรอล ไม่สามารถให้พลังงานแก่ร่างกาย พบได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะของสัตว์ทุกชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน ไม่พบในพืช เป็นสเตอรอลอย่างเดียวกับที่ผ่านผนังลำไส้ได้ ลักษณะคล้ายขี้ผึ้งสีขาว ร่างกายมนุษย์ได้รับคอเลสเตอรอล 2 ทาง คือ จากการสังเคราะห์ขึ้นเอง (endogenous origin) และได้รับจากอาหาร (exogenous origin) ร่างกายสังเคราะห์คอเลสเตอรอลขึ้นเองได้ การสร้าง คอเลสเตอรอลในร่างกายเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา โดยที่ตับจะทำหน้าที่เปลี่ยนคอเลสเตอรอลให้เป็นกรดน้ำดีและกรดน้ำดีจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นเกลือน้ำดี ซึ่งจะช่วยให้ไขมันแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็กๆ และดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้น ปริมาณของคอเลสเตอรอลที่ร่างกายสร้างขึ้นประมาณ 15 ถึง 20 กรัมต่อวัน ส่วนที่ร่างกายได้รับจากอาหารมีเพียง 0.3 กรัมต่อวัน ซึ่งคอเลสเตอรอลที่ได้จากอาหารส่วนใหญ่เป็นคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ และถูกขับถ่ายออกในสภาพของน้ำดี ระดับคอเลสเตอรอล ในเลือดของคนปกติอายุระหว่าง 20-50 ปี จะประมาณ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

คอเลสเตอรอลที่มีอยู่ในร่างกายแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดตามความหนาแน่น คือ

1. Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) เป็นคอเลสเตอรอลที่มีความหนาแน่นต่ำ LDL-C เป็นตัวเริ่มต้นของการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน และเป็นส่วนประกอบของกรดน้ำดี แต่ถักร่างกายมี LDL-C ในปริมาณมากจน receptor รับไม่ได้ หรือเกิดความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ขาด receptor หรือ receptor ไม่เพียงพอจะทำให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือด

2. High density lipoprotein cholesterol (HDL-C) เป็นคอเลสเตอรอลที่มีความหนาแน่นสูงในโมเลกุลของคอเลสเตอรอลจะมี HDL-C อยู่ร้อยละ 20 ถ้ามีระดับต่ำกว่านี้จะมีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง

1. บทบาทหน้าที่ของคอเลสเตอรอล

1.1 เป็นส่วนประกอบของเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ระบบประสาท มีคอเลสเตอรอลอยู่มาก

1.2 เป็นสารตั้งต้นของกรดน้ำดีและฮอร์โมนเพศ จำพวกเอสโตรเจน (estrogen) แอนโดรเจน (androgen) และโปรเจสเตอโรน (progesterone) ตลอดจนฮอร์โมนของต่อมหมวกไต

1.3 เป็นสารตั้งต้นของเซแวนตีฮัยโดรคอเลสเตอรอล ซึ่งเมื่อถูกแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเปลี่ยนเป็นวิตามินดี 3 ในผิวหนัง

1.4 เป็นฉนวนของเส้นใยประสาท

ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เป็นไขมันอีกชนิดหนึ่งที่พบในเลือดของมนุษย์ และระดับของไตรกลีเซอไรด์ในเลือดจะใช้เป็นเกณฑ์หนึ่งในการวินิจฉัยว่า บุคคลผู้นั้นอยู่ในภาวะเลือดสูง

หรือไม่นอกจากการพิจารณาระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ร่างกายได้รับไตรกลีเซอไรด์ 2 ทาง คือ จากอาหารไขมันที่บริโภคเข้าไปอยู่ในรูปของ chylomicron triglyceride (chylomicron-TG) และจากการสังเคราะห์ที่ตับจากอาหารแป้งที่บริโภคเข้าไป ซึ่งสังเคราะห์ได้เป็น very low density lipoprotein triglyceride (VLDL-TG)

2.10 หน้าที่และความสำคัญของไขมัน

2.10.1 เป็นส่วนประกอบของร่างกาย โครงสร้างผนังเซลล์และในการสร้างเซลล์สมอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กก่อนคลอด เซลล์ในร่างกายทั้งหมดจะประกอบด้วยไขมัน ในผู้หญิงที่แข็งแรงและไม่อ้วนจะมีไขมันอยู่ร้อยละ 18-25 ของน้ำหนักตัว ในขณะที่ผู้ชายในภาวะเดียวกันจะมีไขมันอยู่ร้อยละ 15-20 ของน้ำหนักตัว

2.10.2 เป็นแหล่งของพลังงาน ไขมัน 1 กรัม ให้พลังงาน 9 กิโลแคลอรี ในภาวะปกติ ไขมันจะให้พลังงานร้อยละ 40 ของพลังงานทั้งหมด แต่ในภาวะอดอาหารจะให้พลังงานเกือบร้อยละ 100 จากไขมันที่สะสมไว้ในเนื้อเยื่อไขมันที่ได้ผิวหนังในช่องท้องรอบ ๆ อวัยวะภายในและแทรกอยู่ทั่วไปในกล้ามเนื้อ

2.10.3 เป็นแหล่งของวิตามินที่ละลายในไขมัน และช่วยการดูดซึมของวิตามินเหล่านั้น เช่น เนยเหลืองมีวิตามินเอมาก น้ำมันรำมีวิตามินดีมาก น้ำมันตับปลามีวิตามินเอและดีมาก ถ้าร่างกายไม่ได้ไขมันเหล่านี้จะเข้าไปไม่ได้

2.10.4 ป้องกันการกระทบกระเทือนของอวัยวะภายใน ไขมันที่อยู่รอบอวัยวะสำคัญภายใน เช่น ในช่องอก ช่องท้อง ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันการกระทบกระเทือนของอวัยวะเหล่านั้น

2.10.5 เป็นแหล่งของกรดไขมันจำเป็น ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์ และใช้ในการสร้างเซลล์สมอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กก่อนคลอด จากการศึกษา พบว่ากรดไลโนเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นจะเร่งการเผาผลาญคอเลสเตอรอลไปเป็นน้ำดี และอาจลดการหลั่ง LDL โดยตัวยับ นอกจากนี้กรดไลโนเลอิกช่วยลดไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ลดการจับตัวของเกล็ดเลือดและลดความดันโลหิตด้วย

2.10.6 จำเป็นสำหรับการเติบโตและสุขภาพทางผิวหนังของทารกและเด็ก

2.10.7 สามารถเปลี่ยนเป็นคาร์โบไฮเดรตและกรดไขมันไม่จำเป็นได้เมื่อร่างกายต้องการ

2.10.8 ไขมันใต้ผิวหนังช่วยป้องกันการเสียความร้อนออกจากร่างกายทางผิวหนัง เพราะเป็นสื่อนำความร้อนที่เลว

2.10.9 คอเลสเตอรอลจำเป็นในการสังเคราะห์ provitamin D, adrenocortical hormones, steroid sex hormones and bile salts

2.10.10 ฟอสโฟลิปิด ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟอิงเอเจนต์ (emulsifying agents) ที่มีประสิทธิภาพมาก จึงเป็นตัวสำคัญในการย่อยและดูดซึมไขมัน และช่วยให้เซลล์นำเอากรดไขมันไปใช้ได้

2.11 แหล่งของน้ำมันและไขมันจากอาหาร จำแนกตามประเภทอาหารที่เป็นต้นกำเนิดได้ 2 พวก

2.11.1 น้ำมันและไขมันจากพืช เป็นน้ำมันที่สกัดจากส่วนต่างๆของพืช เช่น น้ำมันสกัดจากส่วนเมล็ด เช่น น้ำมันที่สกัดจากข้าวโพด เมล็ดฝ้าย งา ถั่วลิสง ถั่วเหลือง และเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันสกัดจากส่วนเนื้อหุ้มเมล็ด เช่น น้ำมันที่สกัดจากมะกอก น้ำมันรำ และปาล์ม น้ำมันสกัดจากเนื้อภายในเมล็ด เช่น น้ำมันที่สกัดจากมะพร้าวและเนยเทียมได้จากส่วนผสมของน้ำมันพืชต่างๆน้ำมันและไขมันจากพืชทั่วไปยกเว้นโกโก้ มะพร้าว และปาล์ม มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันจำเป็นมากกว่าไขมันจากสัตว์ โดยเฉพาะกรดไขมันกลุ่มโอเมก้าหก เช่น กรดไลโนเลอิก มีประโยชน์ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด แต่มีข้อเสีย คือลด HDL-cholesterol ด้วย นอกจากนี้พบว่าน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดพืชจะมีกรดไลโนเลอิกสูงกว่าน้ำมันที่สกัดจากเนื้อพืช

2.11.2 ไขมันและน้ำมันสัตว์ เป็นน้ำมันที่ได้จากไขมันสัตว์ ไขมันสะสมในสัตว์และไขมัน ที่แทรกปะปนอยู่ในอวัยวะต่างๆ ไขมันและน้ำมันจากผลิตภัณฑ์นม เช่น เนย ครีม (ได้จากนํ้านม ที่แยกเอาส่วนไขมันออก) ไขมันและน้ำมันจากสัตว์ เช่น น้ำมันหมู เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อไก่ ไขมันและน้ำมันจากสัตว์น้ำเค็ม เช่น น้ำมันปลาสกัดจากเนื้อปลา หนัง หัว และหางของปลา ทะเล น้ำมันตับปลา สกัดจากตับของปลาทะเล

ในปัจจุบันมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า น้ำมันที่ได้จากปลามีประโยชน์เช่นเดียวกับน้ำมันพืช เพราะมีกรดไขมันกลุ่มโอเมก้าสาม ซึ่งสามารถลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจโดยช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด โดยสามารถแทนที่กรดไขมันกลุ่มโอเมก้าหก ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ทุกชนิดได้

ดังนั้นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้าสาม จึงมีบทบาทสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการในเด็ก

3. อนุมูลอิสระ

ในสิ่งแวดล้อม มีสารมลพิษ สารเคมี รังสี และอนุมูลอิสระที่มีผลกระทบต่อการทำงานของสารพันธุกรรม และทำให้เกิดความเสื่อมสภาพและโรคหลายชนิด เช่น มะเร็ง เอ็ดส์ การเสื่อมสภาพของเซลล์ ความชรา โรคข้ออักเสบ ฯลฯ (Dasgupta and De ,2006) อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอย่างน้อย 1 ตัวโคจรรอบวงนอกสุดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก และมีอิเล็กตรอนเดี่ยวคงเหลือบนอนุมูล อิเล็กตรอนเดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระมีเสถียรต่ำและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียร และเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) นักวิทยาศาสตร์ได้วิจัยผลกระทบทางชีวภาพและพยาธิสภาพที่เกิดจากสารพิษและกลไกในการทำลายเซลล์มานานแล้ว และได้พบว่าการเกิดโรคต่าง ๆ ดังกล่าว มีสาเหตุและ

กลไกเนื่องมาจากการเพิ่มของอนุมูลอิสระ การเพิ่มของปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการลดลงของสารต่อต้านอนุมูลอิสระ หรือแอนติออกซิแดนท์ ดังนั้น การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและสามารถพบในพืชอาหาร รวมถึงพืชสมุนไพรไทยจึงมีความสำคัญมา

ตารางที่ 4 อนุมูลอิสระและสัญลักษณ์

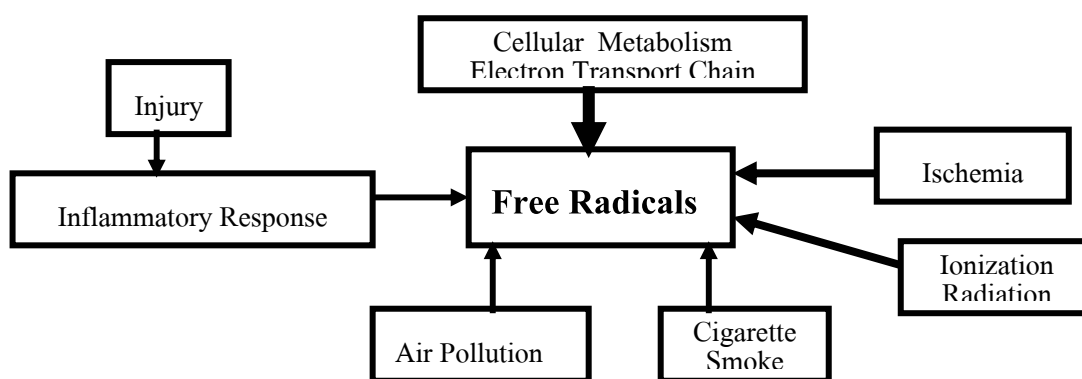
อนุมูลอิสระ	สัญลักษณ์
Hydrogen atom	$\text{H}^\bullet$
Hydroxyl radical	$\text{HO}^\bullet$
Hydroperoxyl radical	$\text{HOO}^\bullet$
Alkyl radical	$\text{R}^\bullet$
Alkoxy radical	$\text{RO}^\bullet$
Alkylperoxyl radical	$\text{ROO}^\bullet$
Glutathyl radical	$\text{GS}^\bullet$
Methyl radical	$\text{CH}_3^\bullet$
Nitric oxide	$\text{NO}^\bullet$
Nitrogen dioxide	$\text{NO}_2^\bullet$

3.1 แหล่งของอนุมูลอิสระ

3.1.1 อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในร่างกายจากการชนถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการเผาผลาญอาหารให้เกิดเป็นพลังงานโดยใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรีย อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกจับโดยออกซิเจนเกิดเป็น อนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ตัวอย่างเช่น อนุมูลอิสระของ hydroxyl, superoxide และ peroxyl อนุมูลอิสระชนิดอื่นที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น reactive nitrogen species ตัวอย่างเช่น nitric oxide, nitrogen dioxide และอนุมูลอิสระ glutathyl และ methyl

นอกจากการเผาผลาญอาหารที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระแล้ว แหล่งอื่นในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่ ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ เช่น xanthine oxidase, prostaglandin synthase, lipoxygenase, aldehyde oxidase ปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสภาวะทางอารมณ์ เช่น ความเครียด และพยาธิสภาพของร่างกายเช่นการมีไข้ การติดเชื้อ เป็นต้น

3.1.2 อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย ได้แก่ รังสี ไอโซน ควันทุหรือ อนุมูลอินทรีย์ ตัวทำลายอินทรีย์ และมลภาวะต่างๆ มีผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคระบบหลอดเลือด และหัวใจ โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคข้ออักเสบ และโรคต่อกระจาก รวมทั้งโรคเสื่อมของเซลล์ หรือภาวะชรา (aging) (Dasgupta and De ,2006)



ภาพ 2 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ (free radicals)

ที่มา : Dasgupta and De (2006)

4. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารแอนติออกซิแดนท์ หรือ สารต้านออกซิเดชั่น คือ สารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น สารเหล่านี้อาจพบในธรรมชาติ พืชผักผลไม้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น วิตามินซี วิตามินอี หรือ เบต้าแคโรทีน รวมทั้งโคเอนไซม์ ซีลีเนียม ทองแดง แมงกานีส และเหล็ก เป็นต้น หรือ เป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร เช่น BHA BHT gallate เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายคน เพื่อป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลตัวอื่น ตามปกติในเซลล์จะมีสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์และไม่เอนไซม์ทำหน้าที่ทำลายอนุมูลอิสระ แต่ถ้ามีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมาก หรือฤทธิ์การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีน้อยก็เกิดสภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress มีสารอนุมูลอิสระไปทำลายส่วนประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อ ส่วนประกอบสำคัญที่จะถูกทำอันตราย คือ ดีเอ็นเอ โปรตีน และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังหุ้มเซลล์ ดังนั้นการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยการกินในรูปของอาหารจะช่วยเสริมประสิทธิภาพของร่างกายในการทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ

กลไกการต้านอนุมูลอิสระทำลายอนุมูลอิสระโดยการให้หรือรีดิวซ์อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระทำให้ปฏิกิริยาถูกใช้สิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระโดยตัวเองจะไม่กลาย เป็นอนุมูลอิสระเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเนื่องจากตัวมันเองมีความคงตัวทั้งในรูปอิเล็กตรอนครบและอิเล็กตรอนขาด

หรือเกิน กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 2 กลไกตามลักษณะการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ

5. อาหารต้านอนุมูลอิสระ

ตัวอย่างอาหารที่จัดว่าเป็นกลุ่มอาหารต้านอนุมูลอิสระมีดังต่อไปนี้

5.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย และจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

5.1.1 เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ไดมิวเตส (superoxide dismutase) ซึ่งต้องการแร่ธาตุทองแดง ได้แก่ ตับ เนื้อ อาหารทะเล

5.1.2 เอนไซม์คะตะเลส (catalase) เอนไซม์ตัวนี้จะให้ธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ และธาตุเหล็กพบมากในเครื่องในสัตว์ ตับ ไต หัวใจ เลือด เนื้อวัว เนื้อปลา ไข่ ผักใบเขียว ธัญพืช (cereal) ที่เสริมเหล็ก

5.1.3 กลุ่มเอนไซม์กลูตาไทโอน ได้แก่ กลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) กลูตาไทโอน-เอส-ทรานส์เฟอเรส (glutathione S-transferase) เอนไซม์กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดสต้องการเซเลเนียมเป็นองค์ประกอบ เซเลเนียมพบว่ามีมากในอาหารทะเล ตับ ไต และเนื้อสัตว์ กรณีของกลุ่มเอนไซม์กลูตาไทโอนนี้ จะทำงานโดยมีไตรเพปไทด์กลูตาไทโอนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไตรเพปไทด์กลูตาไทโอนจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ กรดอะมิโนไกลซีน กลูตาเมต และซีสเทอีน นอกจากกรดอะมิโนดังกล่าวแล้ว ยังพบว่ามีสารอาหารหลายชนิดที่มีผลช่วยเพิ่มระดับกลูตาไทโอน ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินบี 2 วิตามินบี 6 ธาตุซีลีเนียม สังกะสี และแหล่งสารอาหารเหล่านี้ได้แก่ ถั่วเหลือง นม ไข่ กระเทียม หั่นดอกกระหล่ำ เนื้อปลา

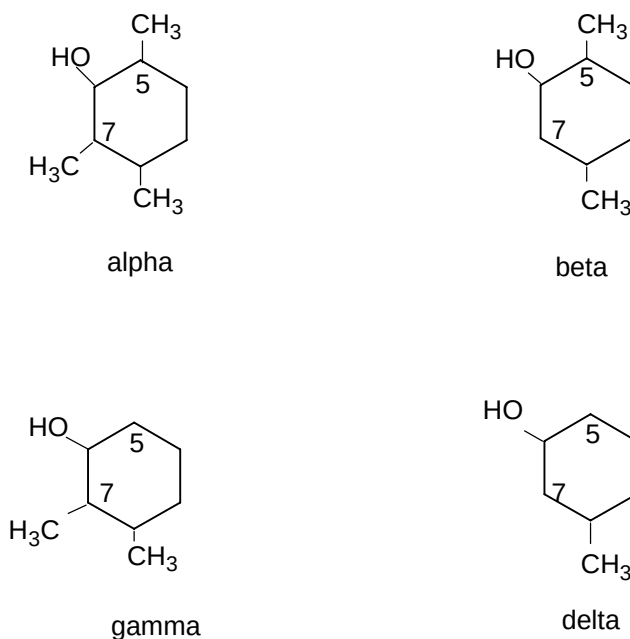
5.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารและไม่จัดเป็นเอนไซม์

5.2.1 วิตามินอี (Tocopherol)

วิตามินอี เป็นสารอาหารที่จัดอยู่กลุ่มวิตามินชนิดละลายในไขมัน (fat soluble vitamin) มีชื่อทั่วไปว่า Tocopherol ซึ่งลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน สีเหลืองอ่อนไม่ละลายในน้ำ ละลายได้ในสารละลายไขมัน เช่น แอลกอฮอล์ อีเทอร์ วิตามินอีมีความสำคัญต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ในธรรมชาติมี Tocopherol สำคัญ 4 ชนิด คือ α -Tocopherol, β -Tocopherol, γ -Tocopherol และ δ -Tocopherol ซึ่งตัวที่มีฤทธิ์ของวิตามินมากที่สุดและนำมาใช้ทางการแพทย์ คือ α -Tocopherol (พันธุ์ทิพย์, 2537)

วิตามินอีในธรรมชาติเป็นกลุ่มสารพวก α -Tocopherol หรือ methyltocols โมเลกุลของวิตามินอีประกอบด้วยวงแหวน Chromanol และหมู่ข้างเคียงที่เป็น unsaturated phytyl group

วิตามินอีละลายได้ดีในไขมัน และสารตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถถูกออกซิไดซ์หรือถูกทำลายด้วยออกซิเจนได้ง่าย (ศิริวรรณ และไมตรี, 2534)



ภาพ 3 โครงสร้างอนุพันธ์ของวิตามินอี ซึ่งจะแตกต่างกันในหมู่ methyl ตำแหน่งที่ 5 และตำแหน่งที่ 7

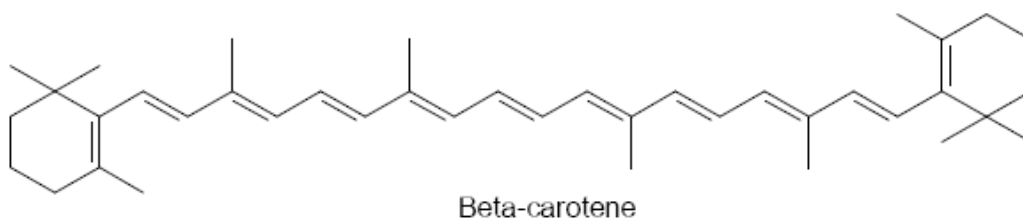
ประโยชน์ของวิตามินอี คือ มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) ในร่างกายเนื่องจาก อนุมูลอิสระนั้นเป็นอิเล็กตรอนที่ขาดคู่ จึงล่องลอยไปทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นเรื่อยไป เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทางเคมีที่เป็นโทษกับร่างกาย เพราะอนุมูลอิสระเหล่านี้ก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ อันเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้ง่ายขึ้น เช่น โรคหัวใจ , อัมพาต, ข้อเสื่อม, ผิวหนังเหี่ยวย่น, ต้อกระจก ตลอดจนโรคมะเร็ง ซึ่งวิตามินอี มีสถานะภาพของการเป็นสารต้านออกซิเดชั่น จะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าวเพื่อป้องกันเซลล์ไม่ให้เสื่อมสภาพเร็ว และช่วยต้านทานการก่อตัวของโรคเหล่านี้ด้วย นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิต ป้องกันการจับตัวของเกล็ดเลือด ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดอันเกิดจากการพอกพูนของไขมันในหลอดเลือด เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง ป้องกันและชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ผิว อันเป็นสาเหตุของความแก่ ช่วยส่งเสริมการทำงานของวิตามินเอ ช่วยป้องกันเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ เช่น ผิวหนัง และลดการและลดการสะสมของไขมันตามผนังด้านในของหลอดเลือดที่มีมากขึ้นตามอายุ ช่วยในการทำงานของสมองเป็นปกติ และสม่ำเสมอ ลดการสะสมของอนุมูลอิสระในสมองซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคความจำเสื่อมในวัยชรา (ศรีนวล , 2544)

มีรายงานการวิจัยในการศึกษาความสำคัญของวิตามินอีนอกเหนือจาก α -tocopherol พบว่าอัตราส่วนของอนุพันธ์ของวิตามินอี ระหว่าง γ -, δ -, and α -tocopherol ในอัตราส่วน 5:2:1 ตามลำดับ สามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี กว่าการใช้ α -tocopherol เพียงชนิดเดียว (Saldeen et al., 2005)

แหล่งของวิตามินอี วิตามินอีพบมากในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลืองน้ำมันข้าวโพด เมล็ดฝ้าย และดอกคำฝอย นอกจากนั้นยังพบว่ามีสูงในต้นอ่อนของข้าวสาลี ถั่วเหลืองแข็งชนิดต่างๆ และเนื่องจากอาหารกลุ่มที่ให้วิตามินอีเป็นแหล่งอาหารที่ให้ไขมันค่อนข้างสูงจึงไม่ควรบริโภคมากเกินไป

5.2.2 เบต้าแคโรทีน

เบต้าแคโรทีนพบมากในพืชที่มีสีเหลือง และสีส้ม เช่น หัวแครอท หัวผักกาดแดง มะเขือเทศ เป็นต้น เป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์วิตามินเอ โดยร่างกายมนุษย์สามารถเปลี่ยน 9-*cis*-beta-carotene ไปเป็นวิตามินเอที่ตับและลำไส้ด้วยเอนไซม์ 15,15'-beta-carotenoid dioxygenase ซึ่งวิตามินเอ เป็นสารที่มีความสำคัญต่อการมองเห็น การสร้างสเปิร์ม การสร้างกระดูกและฟัน การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และสุขภาพของผิวหนัง เบต้าแคโรทีนตามธรรมชาติ มี 2 ไอโซเมอร์ คือ *alltrans* isomers และ *cis*-isomers และพบว่าเฉพาะ 9-*cis* betacarotene ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเรตินอลหรือวิตามินเอได้ เบต้าแคโรทีนยังใช้ในการรักษาโรคบางชนิด เช่น โรคกระดูก ความผิดปกติของผิวหนังอันเนื่องมาจากความไวต่อแสง ซึ่งการที่ผิวหนังมีความไวต่อแสงจะกระตุ้นให้มีการสร้างพอฟีริน (porphyrins) ที่ผิวหนังซึ่งจะดูดกลืนพลังงานจากแสงและทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำลายเซลล์และทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ การได้รับเบต้าแคโรทีนจะทำให้อาการเจ็บปวดลดลง เนื่องจาก เบต้าแคโรทีนไปหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ (วีระศักดิ์, 2548)



ภาพ 4 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน
ที่มา : วีระศักดิ์ (2548)

5.2.3 วิตามินซี (Ascorbic acid)

แหล่งอาหารที่ให้วิตามินซี ผักและผลไม้ที่มีวิตามินสูง ได้แก่ ฝรั่ง ส้ม มะนาว มะเขือเทศ คื่นห่าน บรอกโคลี วิตามินซี หรือ L-ascorbic acid ซึ่งคนไม่สามารถสร้างได้ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น คนเราควรได้รับวิตามินซี วันละ 60 มิลลิกรัม เทียบเท่ากับการกินส้มเขียวหวาน ขนาดกลาง 1 ผล หรือฝรั่งประมาณ ¼ ผลกลาง

5.2.4 เซเลเนียม

เซเลเนียมเป็นส่วนประกอบสำคัญของเอนไซม์กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดสช่วยเร่งการทำลายของอนุมูลอิสระชนิดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ เซเลเนียม ยังทำหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอีกด้วย เซเลเนียมเป็นเกลือแร่ที่ทำหน้าที่ประสานการทำงานของเอนไซม์ระหว่าง วิตามินอี วิตามินเอ และวิตามินซี ได้จาก หอมแดง หอมใหญ่ กระเทียม ต้นหอม ต้นกระเทียม มะเขือเทศ และส่วนใหญ่จะพบมากในอาหารทะเล ตับ ไข่ และเนื้อสัตว์

5.2.5 โพลีฟีนอล (Polyphenol)

โพลีฟีนอล จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีลักษณะโครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมาเกาะ (HO) เป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอลลิก มีอยู่ในธรรมชาติในรูปอะไกลโคไซด์ หรือจับกับน้ำตาลเป็นไกลโคไซด์ หรือจับกับน้ำตาลที่เป็นไกลโคไซด์มีโครงสร้าง 2 ส่วน คือ C_6 และ C_3-C_6 พบได้ในทุกส่วนของพืช

ประโยชน์ของฟลาโวนอยด์ มีบทบาทหลายๆ อย่างในพืช ได้แก่

1. เป็น Antioxidant ให้กับ Ascorbic Acid ซึ่งพบมากในเซลล์พืช
2. เป็น Enzyme Inhibitor
3. เป็นสารตั้งต้นของสารพิษต่างๆ
4. เป็นสารที่ทำให้เกิดสีต่างๆ ในพืชและเป็นสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช
5. เป็นตัวป้องกันแสง เพราะว่าฟลาโวนอยด์จะค่อนข้างคงตัวในช่วงความยาวคลื่นแสง

Ultraviolet และ Visible

6. ป้องกันพืชจากสารพิษอื่นๆ โดยทำหน้าที่เป็น Photosensitizing compound โดยเฉพาะพวก Methoxylated Flavonoid

7. ช่วยในการสังเคราะห์และหายใจของพืชตลอดจน Morphogenesis นอกจากนี้ ฟลาโวนอยด์จำนวนมากยังมีพิษทางเภสัชวิทยาต่อคนและสัตว์ ได้แก่

- ทางด้านรสชาติ สัตว์อื่นๆ ไม่ชอบความขมของฟลาโวนอยด์ ยกเว้นแมลง
- มีฤทธิ์เป็น antibiotic โดยมีสารแอนโทไซยานิน ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ

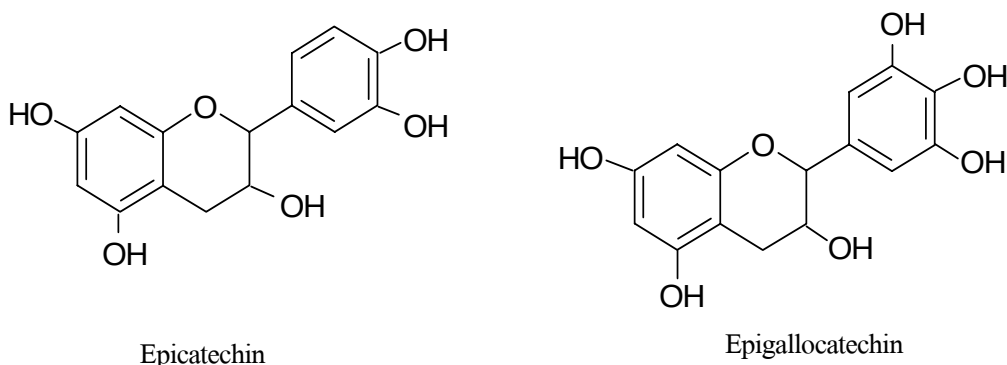
แบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus* , *Salmonella* , *Shigella* เป็นต้น

- มีฤทธิ์เป็น Antimalignancy พบว่า Eupatin และ Centaureidin มีฤทธิ์ในการยับยั้ง Carcinoma จาก Nasopharynx ทำให้เพิ่มความเพิ่มความต้านทานให้กับหลอดเลือดฝอย ได้แก่ ฟลาโวนอน ฟลาโวนอล Flavandiol และ Chalcone

5.2.6 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มของสารที่มีหมู่ฟีนอล ซึ่งเป็นวงเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) มาเกาะ จำนวนมากในโมเลกุล ดังภาพประกอบ 4 สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีในธรรมชาติ พบทั่วไปในผักและผลไม้ มีมากมายหลายชนิดซึ่งสามารถจำแนกได้ตามลักษณะของจำนวนคาร์บอนอะตอม และโครงสร้างพื้นฐาน

Polyphenol จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีลักษณะโครงสร้างพื้นฐานในโมเลกุล ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (HO) มาเกาะ เป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอลิก มีอยู่ในธรรมชาติในรูปอะไกลโคไซด์ หรือจับกับน้ำตาลเป็นไกลโคไซด์ หรือจับกับน้ำตาลที่เป็นไกลโคไซด์มีโครงสร้าง 2 ส่วน คือ C_6 และ C_3-C_6 พบได้ในทุกส่วนของพืช



ภาพ 5 โครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก

1. คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกนั้นมีจำนวนมากหลายชนิด และชนิดที่จำเป็นจำนวนมากเป็นกลุ่มหลักคือ สารกลุ่ม Flavonol glycosides โดยสารกลุ่มใหญ่กลุ่มนี้คือ สารฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารในธรรมชาติสามารถพบได้เป็นจำนวนมากในพืช ผักและผลไม้ เช่น quercetin, myricetin และ keampferal เป็นต้น (Perira, Pineda and Aguilar. 2007 : 2287–2295) ประโยชน์ของฟลาโวนอยด์มีบทบาทหลาย ๆ อย่างในพืช ได้แก่

1. เป็นสารต้านอนุมูลอิสระให้กับ ascorbic acid ซึ่งพบมากในเซลล์พืช
2. เป็น enzyme inhibitor
3. เป็นสารตั้งต้นของสารพิษต่างๆ
4. เป็นสารที่ทำให้เกิดสีต่างๆ ในพืชและเป็นสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช

5. เป็นตัวป้องกันแสง เพราะว่าฟลาโวนอยด์จะค่อนข้างคงตัวในช่วงความยาวคลื่นแสง Ultraviolet และ Visible

6. ป้องกันพืชจากสารพิษอื่นๆ โดยทำหน้าที่เป็น photosensitizing compound โดยเฉพาะพวก methoxylated flavonoid

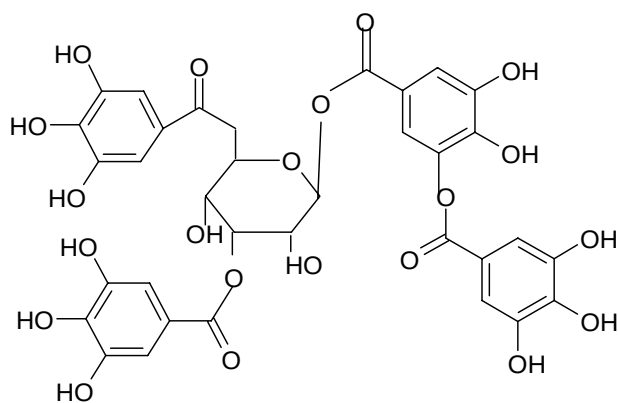
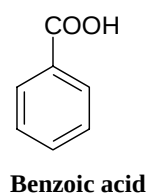
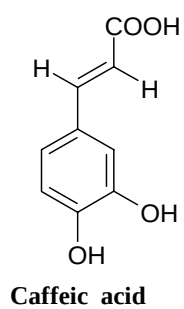
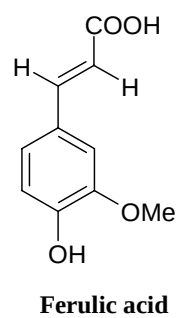
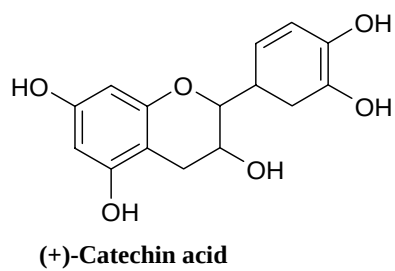
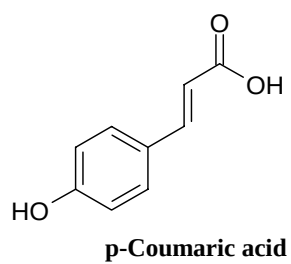
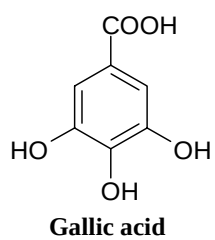
7. ช่วยในการสังเคราะห์และหายใจของพืชตลอดจน morphogenesis นอกจากนี้ ฟลาโวนอยด์จำนวนมากยังมีพิษทางเภสัชวิทยาต่อคนและสัตว์ ได้แก่

7.1 ทางด้านรสชาติ สัตว์อื่นๆ ไม่ชอบความขมของฟลาโวนอยด์ ยกเว้นแมลง

7.2 มีฤทธิ์เป็น antibiotic โดยมีสารแอนโทไซยานิน ที่สามารถยับยั้ง

การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Shigella* เป็นต้น

7.3 มีฤทธิ์เป็น antimalignancy พบว่า eupatin และ centaureidin มีฤทธิ์ในการยับยั้ง carcinoma จาก nasopharynx ทำให้เพิ่มความเพิ่มความต้านทานให้กับหลอดเลือดฝอย ได้แก่ ฟลาวาโนน ฟลาวานอล flavandiol และ chalcone

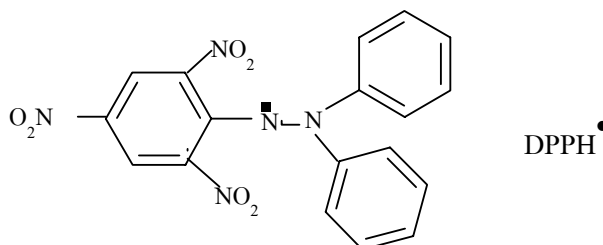


Tannin acid

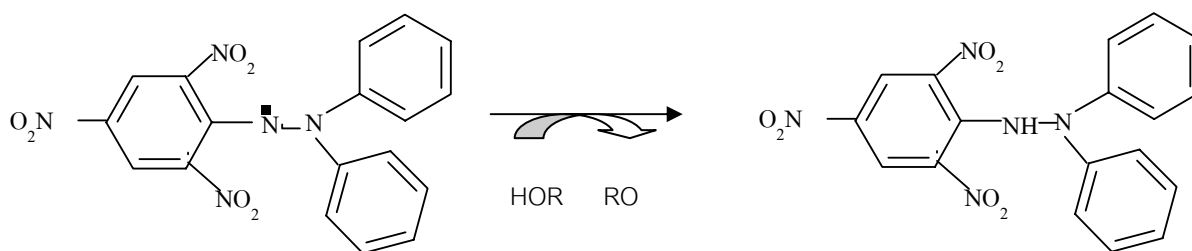
ภาพ 6 โครงสร้างของกลุ่มสารฟีนอลิก

6. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1. การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารไดฟีนิลไพคริลไฮดราซิล (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร ดังภาพ 7 โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นของสาร DPPH (Dasgupta and De. 2004 :219-224) โดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถให้อะตอมไฮโดรเจนแก่ อนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล เกิดการฟอกจางสีไปเป็นสีเหลือง (โอภา วัชรคุปต์. 2549 : 1-200) ดังภาพ 8 การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรวัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารอนุมูลลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีที่ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีพื้นฐานเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยา เหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของอนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ ดังแสดงในภาพ 8 แสดงให้เห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้า นอกจากนี้สาร รีดิวซ์สามารถทำให้สี อนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ จางลง (โอภา วัชรคุปต์. 2549 : 1-200)



ภาพ 7 โครงสร้างของสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

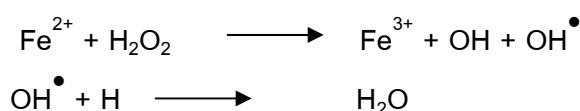


2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

ภาพ 8 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระต่อ อนุมูล DPPH[•]

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity

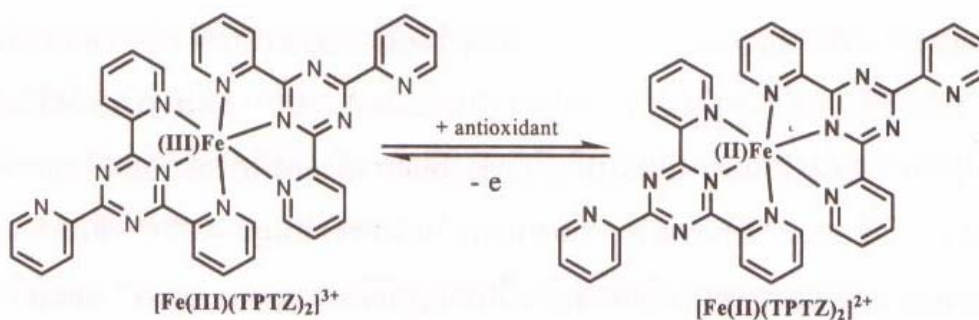
กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งไฮดรอกซิลเรดิคัลที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton reaction โดยจะให้ไฮโดรเจนแก่ออนุมูลอิสระให้หมดสภาพไปเป็นสารที่ไม่เป็นอันตราย ที่มีการกระตุ้นการทำปฏิกิริยาจาก FeSO_4 และการสลายตัวของ 2-deoxyribose ที่เป็นน้ำตาลใน DNA ซึ่งถือว่าเป็นสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตและนอกจากนั้นยังกระตุ้นการสลายตัวของ H_2O_2 ให้ไปเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล ($\text{OH}^\bullet$) เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย thiobarbituric acid ให้สารที่มีสีชมพู (Trouillas and others. 2003 : 399-407) โดยมีกลไกในการทำปฏิกิริยา ดังภาพประกอบ 9



ภาพ 9 การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา Fenton reaction

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing/antioxidant power

วิธี FRAP วิธีนี้เป็นวิธีวิเคราะห์หาค่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยตรง มีหลักการว่าสารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอนจึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระเป็นความสามารถรวมในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (โอภา วัชรคุปต์. 2549 : 1-200) ดังแสดงในภาพ 10

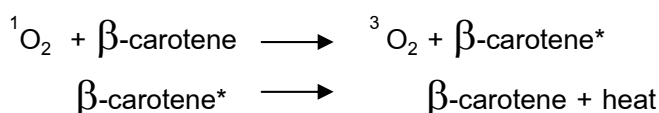


ภาพ 10 การรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} -TPTZ

วิธี FRAP เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 4 - 6 นาที มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่มีข้อเสียคือ กลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกในร่างกาย (โอภา วัชรคุปต์. 2549 : 1-200)

4. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาลิปดออกซิเดชัน ด้วยวิธี β -carotene-linoleate bleaching

เป็นการวัดการฟอกสีของ β -carotene โดยการใช้เครื่อง UV-spectrophotometric ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เป็นผลจากการเกิด β -carotene oxidation โดยการทำลายผลิตภัณฑ์ของ linoleic acid และ Tween เพื่อให้ linoleic acid และ β -carotene เกิดการกระจายในเฟสของเหลว linoleic acid oxidation และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยความร้อน 50 เซลเซียส (Laguerre and others. 2007 : 244-282) ดังสมการ



7. ไกลเคชั่น

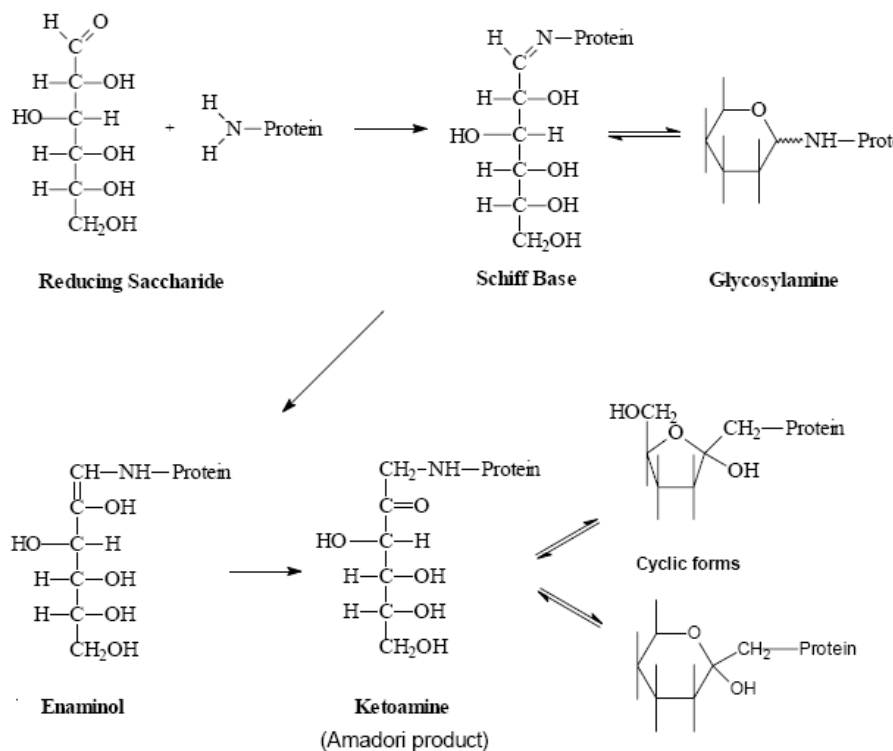
ไกลเคชั่น คือ ปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของน้ำตาล เช่น กลูโคส หรือฟรุกโตส กับโมเลกุลของโปรตีน และไขมันโดยปราศจากการทำงานของเอนไซม์ ไกลเคชั่นเป็นปฏิกิริยาเดียวกับปฏิกิริยาเมลลาร์ด (โดย Louis Camil Maillard) ไกลเคชั่นสามารถเกิดขึ้นได้ภายในร่างกาย ซึ่งการเกิดภายในร่างกายจะเกิดขึ้นในระบบของกระแสเลือด โดยการดูดซึมของน้ำตาล กลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด (Ahmed. 2005 : 3–21) ไกลเคชั่น เป็นปฏิกิริยาที่เริ่มโดย การเติม nuceolic เกิดปฏิกิริยาระหว่างกลุ่มของอะมิโนอิสระในรูปแบบของโปรตีน และ carbonyl group จาก น้ำตาลรีดิคัล ซึ่งอยู่ในรูปของ Schiff base สามารถย้อนกลับในรูปเดิมได้อย่างอิสระ การเปลี่ยนรูปจาก Schiff base ให้อยู่ในรูปที่มีความคงตัว คือ ketoamine หรือ amadori product ดังแสดงในภาพ 11 การพัฒนารูปแบบของ amadori product ไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปยังรูปเดิมได้ ไกลเคชั่น ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกาย ซึ่งมีสาเหตุมาจากการที่ โมเลกุลของน้ำตาลแทรกตัวไปยึดเกาะโมเลกุล ของโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ในร่างกาย ส่งผลให้โปรตีนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ การสื่อสารระหว่างเซลล์ลดน้อยลง ซึ่งเกี่ยวข้องกับ dicarbonyl intermediates อย่างเช่น 3-deoxyglucosones (3-DG) ทำให้เกิด โครงสร้างที่ส่งผลทำให้ สุขภาพของร่างกายเสื่อมลง เรียกว่า advanced glycation end products (AGEs) ดังแสดงในภาพ 12

ภาวะ oxidative stress เป็นปัจจัยสำคัญของพยาธิสภาพของการเกิดโรคเบาหวานทั้งชนิด type 1 และ type 2 ผู้ป่วยโรคเบาหวานจึงมีความเสี่ยงสูงขึ้นต่อการเกิดภาวะเส้นเลือดตีบ ซึ่งส่วนหนึ่งสามารถอธิบายได้จากการเพิ่มปริมาณของไขมัน LDL ที่ถูกออกซิไดส์ (oxidized LDL) และพบว่าปริมาณของวิตามินซีในเลือดของผู้ป่วยจะลดต่ำกว่าคนปกติ ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ลดลงในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน อาจอธิบายได้จากผลการทำลายดีเอ็นเอ จากภาวะ oxidative stress นั้นเอง โดยในผู้ป่วยจะมีปริมาณของสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดขาดและเบส pyrimidine ที่ถูกออกซิไดส์ (oxidized pyrimidines) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ

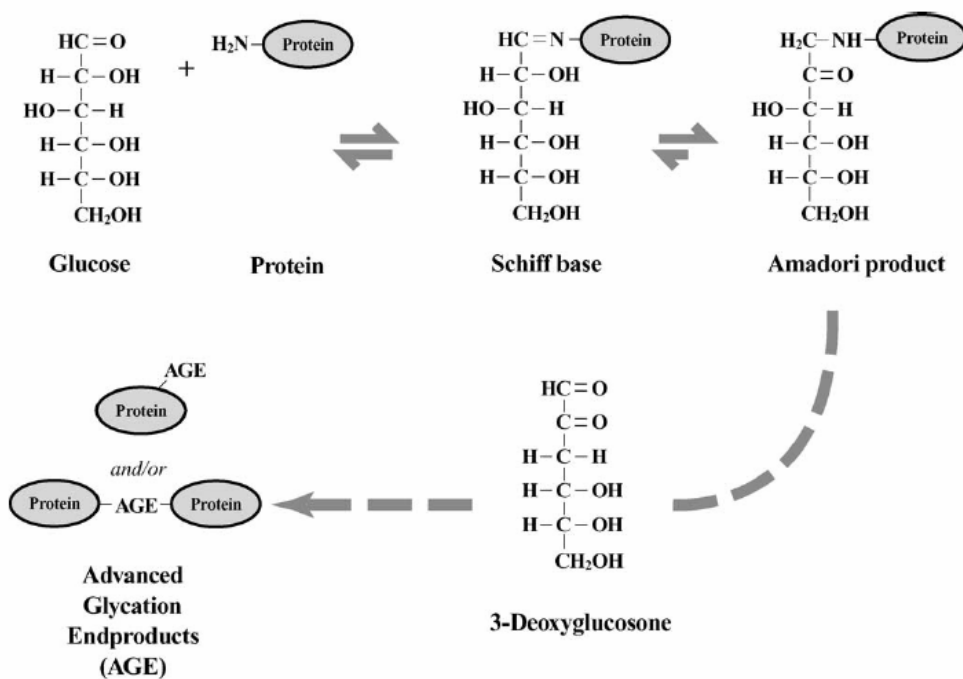
การเกิดไกลเคชั่นของโปรตีนทำให้เกิดการสะสมของ advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระและเชื่อมโยงกับภาวะแทรกซ้อนของโรค ดังแสดงในภาพ 11 โดย AGEs นี้สามารถปลดปล่อยอนุมูลอิสระ และ H_2O_2 และสามารถกระตุ้นการทำงานของ phagocytes นอกจากนี้ยังไปลดปริมาณของ glutathione ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตัวหนึ่งในร่างกายด้วย

ปฏิกิริยาไกลเคชั่นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางคลินิก เช่นโรคเบาหวาน (beta cell damage) โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) อัลไซเมอร์ โรคไต และการสูญเสียทางประสาทสัมผัส เช่น หูหนวก ตาบอด (Ahmed. 2005 : 3–21) ปัจจุบันได้มี

การศึกษาบทบาทของมะระในการลดระดับน้ำตาลในเลือดและความสามารถในการต้านโรคเบาหวานมากขึ้น



ภาพ 11 การเกิด Schiff base และ Amadori compound ในปฏิกิริยาไกลเคชั่น



ภาพ 12 ปฏิกิริยาไกลเคชั่น และกระบวนการเกิด AGEs

8. ไกลเคชั่นกับโรคเบาหวาน

ไกลเคชั่น เป็นสารเคมีที่เกิดจากโปรตีนและน้ำตาลซึ่งเป็นตัวอธิบายถึงการทำงานร่วมกันระหว่างสารไฮเปอร์ไกลเซเมียและเนื้อเยื่อหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับอายุวัย การวิจัยแนะนำว่าน้ำตาลสามารถมีปฏิกิริยากับกลุ่มโปรตีนเพื่อสร้าง cross-links ซึ่งปรากฏในผลลัพธ์ของปฏิกิริยาMaillard ซึ่งเป็นที่รู้จักในนามของ advanced glycation end-products หรือ AGEs

AGEs เป็นชั้นที่สลับซับซ้อนซึ่งไม่มั่นคงถาวรในรูปแบบสารประกอบที่มีปฏิกิริยาในขณะที่มีอายุมากขึ้น เนื่องจากการสะสม “glycation hypothesis” ของ AGEs จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเนื้อเยื่อโปรตีนและลดความสามารถในการแตกตัว มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่ากระบวนการของ AGEs จะถูกเร่งโดย ไฮเปอร์ไกลเซเมีย การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางตัวสังเกตพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานและดูเหมือนจะเป็นกลุ่มคนที่มีอายุ ผู้ป่วยที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคเบาหวานและมีการแนะนำว่าโรคเบาหวานก่อให้เกิดการแก่ก่อนวัย อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า AGEs จะเป็นปัญหาต่อกลุ่มคนที่เป็นโรคเบาหวานแต่ก็ยังพบเห็นในทุกคนแต่มีจำนวนน้อยซึ่งจะสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อปริมาณน้ำตาลในเส้นเลือดเพิ่มมากขึ้น AGEs จะถูกสร้างขึ้นเมื่อน้ำตาลในเส้นเลือดมีปริมาณสูงขึ้น เช่น หลังการดื่มน้ำโซดาหรือบริโภคอาหารที่มีน้ำตาลสูงสารเคมีชนิดนี้จะสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานและการทำลายที่เชื่อมโยงกับระบบของร่างกายและทำให้แก่เกินวัย (ลี โนว http://www.intrathailand.net/files/mess/mess_age.pdf)

9. เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร

โรคภัยไข้เจ็บที่เกิดขึ้นในปัจจุบันเกิดจากปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ทางด้านพฤติกรรม การบริโภคของมนุษย์ หรือจากสภาพแวดล้อม ความผิดปกติภายในร่างกายของมนุษย์ ความผิดปกติทางพันธุกรรม และการพัฒนาเชื้อโรค เมื่อร่างกายได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายทำให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย ทั้งโรคที่เกิดจากภายนอกและภายใน โรคที่เกิดจากภายนอกที่พบบ่อยคือ แผล ฝี แผลเรื้อรัง เป็นต้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค คือ กลุ่ม *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. (สุจิรา วีรวรรณ, อมรศรี ชุณหรัศมิ์ และศรัศกุลลักษณ์ สิงคาลวณิช. 2539 : 28) ส่วนโรคภายในที่พบ คือ โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ โรคท้องร่วง ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคคือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Vibrio* sp. เป็นต้น (สุจิรา วีรวรรณ, อมรศรี ชุณหรัศมิ์ และศรัศกุลลักษณ์ สิงคาลวณิช. 2539 : 28) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร

1. *Samonella typhi*

1.1 ลักษณะเชื้อ

Samonella เป็นแกรมลบ รูปท่อน สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ที่อยู่รอบตัว (peritrichous flagella) ยกเว้น *S. pullorum* และ *S. gallinarum* เชื้อนี้ไม่มีแคปซูล และสปอร์เจริญได้ดีในที่มืดและไม่มีออกซิเจน สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคส และแมนโนสได้กรด บางที่ได้ก๊าซด้วย แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทสและซูโครสได้ ให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ หรือก๊าซจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเชื้อส่วนใหญ่ไม่ต้องการวิตามินหรือกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังทนต่อสารเคมีบางอย่าง เช่น บริลเลียนกรีน (brilliant green) โซเดียมเตทราไทโอเนต (sodium tetrathionate) โซเดียมดีออกซีโคเลต (sodium deoxycholate) ซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อพวกโคลิฟอร์ม จึงใช้เป็นหลักในการแยกเชื้อจากอุจจาระ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 91)

1.2 พยาธิกำเนิด

การติดเชื้อ *Samonella* เกือบทั้งหมดได้รับเชื้อทางการกิน ปริมาณเชื้อที่สามารถก่อโรค ประมาณ $10^6 - 10^8$ เซลล์ ยกเว้นเชื้อ *Samonella typhi* ที่สามารถก่อโรคได้แม้ได้รับเชื้อเพียง 10^3 เซลล์ ทำให้การระบาดของโรคนี้เกิดขึ้นได้โดยง่าย เชื้อ *Samonella* สร้างปัจจัยก่อโรคได้หลายชนิด เมื่อเชื้อผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารเชื้อส่วนนี้จะถูกทำลาย โดยกรดในกระเพาะอาหาร เชื้อบางส่วนมีคุณสมบัติทนต่อกรดได้ซึ่งควบคุมโดยยีน acid tolerance response (ATR) การก่อโรคของเชื้อ *Samonella* จัดเป็นการติดเชื้อภายในเซลล์ เนื่องจากเชื้อสามารถมีชีวิตรอดภายในเซลล์ macrophage เชื้อ *Samonella* จึงสามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์และทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อตายในที่สุด รวมถึงยังสามารถกระจายจากเซลล์ติดเชื้อไปยังเซลล์ข้างเคียงได้โดยตรงโดยไม่ผ่านออกนอกเซลล์

1.3 การทำให้เกิดโรค

เชื้อ *Samonella* พบอาศัยและก่อโรคในสัตว์ได้เกือบทุกชนิดทั้งสัตว์ สัตว์ปีก เลี้ยงคาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการแพร่เชื้อมาสู่คน เชื้อบาง serotype ก่อโรคเฉพาะในคน เช่น *Samonella typhi* และ *Samonella paratyphi* ดังนั้นการได้รับเชื้อดังกล่าว จึงเป็นการแพร่จากคนสู่คนหรือผู้ที่เป้นพาหะเท่านั้น ผู้ที่เป็นพาหะสามารถแพร่เชื้อผ่านทางอุจจาระ ส่วนใหญ่จะติดเชื้อโดยการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ โรคติดเชื้อ *Samonella* ที่ลุกลามรุนแรงที่สำคัญได้แก่ (ภัทรชัย กิริติสิน. 2549 : 94)

1.3.1 โรคไข้เอนเทอริก : ไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ (Enteric fevers : typhoid and paratyphoid) เป็นโรคติดเชื้อ *Samonella* ที่สำคัญที่สุด ไข้ไทฟอยด์มีสาเหตุจากเชื้อ *Samonella typhi* ส่วนพาราไทฟอยด์มีสาเหตุจากเชื้อ *Samonella paratyphi* A, B และ C อาการของโรคคล้ายกัน แต่ไข้ พาราไทฟอยด์มีความรุนแรงน้อยกว่าและมีอาการอ่อนกว่าไข้ไทฟอยด์ คือ มีระยะฟักตัว 1- 10 วัน มีอาการโลหิตเป็นพิษเนื่องจากเชื้อเข้ากระแสเลือด ตอนแรกมักมีไข้ 1-3 สัปดาห์ ไม่ค่อยมีผื่น ส่วนไข้ไทฟอยด์มีระยะฟักตัวของโรค 10-14 วัน มีไข้สูงตลอด ปวดศีรษะ

ท้องผูก อ่อนเพลีย ในสัปดาห์แรก อาจมีผื่นขึ้นตามลำตัว หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ ปวดกล้ามเนื้อ ไข้จะขึ้นสูงตลอดเวลา เป็นเวลา 7-10 วัน และลดลงในสัปดาห์ที่ 3 หรือ 4 ตับและม้ามโต เม็ดเลือดขาวลดน้อยลงอุจจาระมีเลือดปนออกมาด้วย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 92)

1.3.2 โรคทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritis) เป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุด โดย serotype ที่ก่อโรคในคนได้บ่อยที่สุด คือ *S. typhimurium* และ *S. enteritidis* กลไกในการก่อโรคในคนยังไม่ชัดเจน หลังจากผู้ป่วยได้รับเชื้อทางการกินอาหารประมาณ 6-48 ชั่วโมง จะเริ่มมีไข้ต่ำ หนาวสั่น ปวดศีรษะ อาเจียน ปวดเกร็งท้อง และ ถ่ายเหลวเป็นน้ำมีอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ อุจจาระมักไม่มีเลือดปนแต่อาจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ พบรอยโรคได้ในลำไส้เล็ก แต่มักไม่มีการลุกลามของเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด ยกเว้นในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยหายได้เองภายใน 1 สัปดาห์ แต่สามารถตรวจพบเชื้อในอุจจาระได้นานหลายสัปดาห์หลังหายจากโรค (ภัทรชัย กิริตสิน. 2549 : 96)

1.3.3 โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) การติดเชื้อ *Salmonella* ในกระแสเลือดมักเกิดจาก *S. choleraesuis* เป็นส่วนใหญ่ และอาจรวมถึง *S. typhi* แต่อาจเกิดจากเชื้อ serotype ใดก็ได้ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จะไปเจริญในกระแสเลือด เพิ่มจำนวนขึ้น จึงทำให้คนมีไข้สูง หนาวสั่น เบื่ออาหาร น้ำหนักตัวลดลง มักไม่พบเชื้อในอุจจาระ โรคนี้จะเป็นอยู่นานจนเรื้อรัง แบคทีเรียในเลือดจะกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ได้อักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ไชกระดูก และกระดูกอักเสบ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 96)

2. *Escherichia coli* O157:H7

2.1 ลักษณะของเชื้อ

E. coli เป็นเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ได้ หรือไม่เคลื่อนที่บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลก็ได้ ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง เช่น macconkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือดบางสายพันธุ์เกิดการสลายเม็ดเลือดแดง เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 109) เชื้อ *E. coli* มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดโดยพบอาศัยเป็นเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหารโดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่พบก่อโรคได้บ่อยกว่าเชื้ออื่น ๆ ในกลุ่ม enterobacteriaceae ส่วนใหญ่ ก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร แต่บางสายพันธุ์ก่อโรคติดเชื้อนอกกระบบทางเดินอาหารได้ เช่นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เชื้อ *E. coli* พบก่อโรคในคนปกติและในคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และเป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยที่สุด (ภัทรชัย กิริตสิน. 2549 : 67)

2.2 ปัจจัยในการทำให้เกิดโรค การที่ *E. coli* ทำให้เกิดโรคได้เนื่องจากมีไวรัลเลนส์แฟกเตอร์ หลายชนิดซึ่งไม่พบใน *E. coli* ที่เป็นเชื้อประจำถิ่น อย่างน้อยที่สุดจะต้องมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่งคือ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 110)

2.2.1 มีความสามารถที่จะเกาะติดกับเซลล์บางชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2.2.2 ความสามารถที่จะบุกรุกและเข้าไปเจริญในเซลล์ของเยื่อบุผิวลำไส้

2.2.3 ความสามารถในการสร้างเอนโทโรทอกซิน ที่ทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและของเหลว จึงทำให้เกิดอาการท้องร่วง

2.2.4 การมีแคปซูลที่ป้องกันไม่ให้ถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน

2.3 โรคติดเชื้อ *Escherichia coli* (ภัทรชัย กิริติสิน. 2549 : 120)

2.3.1 โรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร (gastroenteritic) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *E. coli* ในทางเดินอาหารมักเกิดจากการกินอาหาร และดื่ม น้ำที่ปนเปื้อนเชื้อโรคที่พบได้บ่อยที่สุดคือ โรคท้องร่วง

2.3.2 โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) เชื้อ *E. coli* พบเป็นสาเหตุก่อโรคในทางเดินปัสสาวะได้บ่อยที่สุดทั้งการก่อโรคในชุมชนและการก่อโรคในโรงพยาบาล พบโรคในผู้หญิงได้มากกว่าผู้ชาย ผู้ป่วยมักมีอาการปัสสาวะบ่อยและแสบขัด อาจพบเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวปนในปัสสาวะ กลไกการเกิดโรคที่สำคัญ คือ ascending infection ซึ่งเกิดจากการลุกลามของเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคที่เรียกว่า uropathogenic *E. coli* จากทางเดินอาหารผ่านทางเดินปัสสาวะของผู้ป่วยเข้าทางท่อปัสสาวะและย้อนขึ้นที่กระเพาะปัสสาวะ ทำให้เกิดท่อปัสสาวะอักเสบ ซึ่งเป็นรูปแบบของการติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุด ในบางรายเชื้ออาจลุกลามขึ้นไปถึงไตได้ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรค UTI มีคุณสมบัติสำคัญคือ สามารถสร้างสาร adhesion ได้หลายชนิดโดยเฉพาะ AAF , P pili และ Dr fimbriae เชื้อกลุ่มนี้ยังสามารถสร้างสารพิษ hemolysin เรียกว่า HlyA ซึ่งสามารถทำลายเซลล์หลายชนิดและกระตุ้นการตอบสนองของกระบวนกรอักเสบ

2.3.3 โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis)

เชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกเกิด สายพันธุ์ที่ก่อโรค มักพบการสร้างแคปซูล ที่มี antigen ชนิด K1 ซึ่งสามารถพบเชื้อได้บ่อยในทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงเชื่อว่าทารกอาจได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในช่องคลอด หรือทวารหนักของมารดาในระหว่างการคลอด

2.3.4 โรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ

ที่พบได้บ่อยคือ โรคปอดบวม เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่พบก่อโรคทางเดินหายใจมักเป็นสายพันธุ์ที่โดยทั่วไปไม่ก่อโรค หรือไม่พบการสร้างปัจจัยก่อโรคที่จำเพาะ การติดเชื้อมักเป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีการผิดปกติของร่างกายอยู่เดิม เช่นในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน และผู้ที่มีโรคเรื้อรังในทางเดินหายใจ รวมถึงมักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล เป็นผลให้

มีการติดเชื้อที่รุนแรง และมีอัตราการตายสูง การได้รับเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการสำลักเชื้อที่อาศัยอยู่แบบ colonization ในทางเดินหายใจ

2.3.5 การติดเชื้อในกระแสเลือด

ส่วนใหญ่มักเกิดจากการบุกรุกของเชื้อ เข้าสู่กระแสเลือดในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่อยู่ก่อนเช่น ผู้ป่วยที่มีโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและทางเดินอาหารรวมถึงผู้ป่วยที่มีการทะลุของลำไส้ ทำให้เชื้อประจำถิ่นรวมถึงเชื้อ *E.coli* สามารถเข้าสู่ช่องท้อง และบุกรุกเข้าสู่กระแสเลือดได้ต่อไป ซึ่งพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง

เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ก่อโรคท้องร่วง (Diarrheagenic *E.coli*)

โดยสามารถแบ่งเชื้อตามกลไกการก่อโรคและลักษณะอาการเป็น 5 กลุ่มหลัก ได้แก่

1. Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC)
2. Enteropathogenic *E.coli* (EPEC)
3. Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)
4. Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC)
5. Enteroaggregative หรือ enteroadherent *E.coli* (EAEC)

3. *Klebsiella Pneumoniae*

3.1 ลักษณะเชื้อ *Klebsiella*

จีแนส *Klebsiella* มีความหนาแน่นและสั้นกว่าเอนเทอโรแบคทีเรียอื่นๆ โดยมีรูปร่างเป็นท่อนตรง ยาวประมาณ 1-2 ไมครอน กว้าง 0.5-0.8 ไมครอน มีแคปซูลจึงทำให้โคโลนีมีเมือก และทำให้เชื้อมีความรุนแรง แคปซูลจะสร้างได้มากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตมาก โคโลนีที่มีเมือกมากมีสีขาวปนเทา โคโลนีบนอาหารผสมเลือดมีขนาดใหญ่และเป็นเมือกมาก เชื้อนี้ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 12-43 องศาเซลเซียส เชื้อนี้ถูกทำลายด้วยความร้อนขึ้น 55 องศาเซลเซียส ภายใน 30 นาที สามารถทนความแห้งได้หลายเดือน

สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อนั้นพบว่า *Klebsiella* สปีชีส์ต่าง ๆ ยกเว้น *K. rhinoscleromatis* และสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *K. ozaenae* เป็นพวกหมักน้ำตาลแล็กโตส ทุกสปีชีส์จะไม่หมักน้ำตาล แล็กโทส ไม่เคลื่อนที่และสร้างแคปซูลขนาดใหญ่ ทำให้โคโลนีบนอาหารแข็งมีขนาดใหญ่ เปียกชื้นและเป็นเมือก

3.2 การติดเชื้อ

เชื้อ *Klebsiella* ที่แยกได้มากที่สุดและเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่สุดต่อคนคือ *K. pneumoniae* ซึ่งแยกได้จากทางเดินหายใจหรือลำไส้ของคนที่มีสุขภาพดีประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ *K. pneumoniae* ยังแบ่งได้อีกประมาณ 80 ซีโรทัยป์ ขึ้นกับแอนติเจนของแคปซูล

Klebsiella อาจเป็นสาเหตุของปอดบวม รวมทั้งปอดบวมที่เกิดจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยมีการทำลายเนื้อเยื่อในปอด ทำให้เกิดโพรงหนองและทำให้เสมหะมีเลือด

และชั้นเหนียวนอกจากปอดบวมแล้ว *K. pneumoniae* ยังทำให้เกิดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อที่บาดแผล ในกระแสเลือด และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ *Klebsiella* เป็นเชื้อก่อโรคแกรมลบที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในโรงพยาบาลในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างมากที่สุด (นงลักษณ์ สุวรรณพิณิจ. 2547 : 131)

กลไกการก่อโรคของเชื้อ *Klebsiella* นั้นไม่ทราบชัดเจน ไม่พบการสร้างสารพิษหรือเอ็นไซม์จำเพาะในการก่อโรค นอกเหนือจาก endotoxin ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ปัจจัยที่เชื่อว่าจะมีความสำคัญในการก่อโรคคือ แคปซูลที่พบได้ในสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ เชื้อ *Klebsiella* เชื้อ *K. pneumoniae* สร้างแคปซูลเป็นชั้นหนาช่วยให้สามารถต้านขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว รวมถึงมีฤทธิ์ต้านขบวนการ opsonization ในการทำงานของแอนติบอดี และระบบคอมพลีเมนต์ ชั้นแคปซูลประกอบด้วย K antigen ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อออกได้มากกว่า 70 serotype อย่างไรก็ตามไม่พบว่าแคปซูล serotype ใดที่สัมพันธ์กับการก่อโรคอย่างชัดเจน (ภัทรชัย กิริติสิน. 2549 : 98)

3.3 ความไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียและการรักษา

เชื้อ *K. pneumoniae* ต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ในอัตราสูง สายพันธุ์ส่วนใหญ่ดื้อต่อยา ampicillin, carbenicillin, และ ticarcillin โดยธรรมชาติยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่เลือกใช้ในการรักษาได้ เช่นกลุ่ม extended-spectrum, cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides และ fluoroquinolones อย่างไรก็ตามพบการดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้เพิ่มขึ้น การทดสอบ ความไวต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรีย สำหรับเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจึงมีความสำคัญในการเลือกยาที่เหมาะสมในการรักษา เชื้อบางสายพันธุ์สร้างเอ็นไซม์ extended-spectrum β -lactamase ซึ่งทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่ม β -lactams ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการรักษา (ภัทรชัย กิริติสิน. 2549 : 99)

4. *Vibrio cholerae*

4.1 ลักษณะและการเจริญของเชื้อ

Vibrio cholerae มีลักษณะเป็นท่อนโค้ง สั้นขนาด 0.5 ไมโครเมตร $\times$ 1.5- 3.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ถ้าเลี้ยงในอาหารแข็งนานๆ รูปร่างเชื้อจะเปลี่ยนเป็นท่อนตรง เคลื่อนที่ด้วย แฟลกเจลลาเส้นเดียวที่อยู่ตรงขั้วเซลล์ ไม่สร้างสปอร์เชื้อถูกทำลายด้วยความร้อน 55 องศาเซลเซียส 10 นาที และยาฆ่าเชื้อ ไม่ทนต่อความแห้งแล้งและความเป็นกรด ถ้าหยดเชื้อไว้บนสไลด์เชื้อจะตายภายใน 2 ชั่วโมง แต่ทนต่อความเย็นและ ความชื้นได้ *Vibrio cholerae* เป็นพวกชอบออกซิเจน อุดหนุนที่เหมาะต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส สามารถเลี้ยงได้ในสภาพ pH ตั้งแต่ 6.4- 9.6 และชอบเจริญที่ pH เป็นเบส คือ 7.8 -8.0 ความสามารถในการทนเบสได้จึงใช้เป็นการคัดเลือกเชื้อ (นงลักษณ์ สุวรรณพิณิจ. 2547 : 132)

โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการสายพันธุ์ที่ให้ผลลบในการทดลองเรียกรวมกันว่าเชื้อกลุ่ม *V. cholerae* non-01 เชื้อในกลุ่ม *V. cholerae* non-01 สามารถพบการสร้างแคปซูลซึ่งอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการก่อโรค (ภัทรชัย กิริติสิน. 2549 : 101)

4.2 พยาธิกำเนิดและโรคติดเชื้อ *Vibrio cholerae*

เชื้อ *Vibrio cholerae* เข้าสู่ร่างกายโดยทางการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้อ การเกิดโรคมักได้รับเชื้อในน้ำดื่มปริมาณมากถึง 10^6 - 10^{11} เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร หากเชือบนเปลือกอยู่ในอาหาร ปริมาณเชื้อเพียง 10^2 - 10^4 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร อาจก่อให้เกิดโรคได้ เนื่องจากอาหารช่วยลดความเป็นกรด เชื้อมักไม่บุกรุกเข้าสู่กระแสเลือด ยกเว้นบางรายที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อเข้าทางบาดแผลที่สัมผัสกับน้ำ ที่เป็นแหล่งอาศัยของเชื้อ ความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไปแต่ไม่พบอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ เชื้ออื่นๆ ในกลุ่ม *V. cholerae* non-01 มักก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารที่ไม่รุนแรง หรืออาจสามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหารได้ เช่น การติดเชื้อของบาดแผล และการติดเชื้อในกระแสเลือด ผู้ป่วยได้รับเชื้อทางการกินหรือทางบาดแผลที่สัมผัส กับแหล่งน้ำที่เป็นแหล่งอาศัยของเชื้อ เชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น hemolysin และ heat- stable enterotoxin รวมถึงแคปซูลที่อาจมีบทบาทในการต้านการจับกินของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ (ภัทรชัย กิริติสิน. 2549 : 101) สายพันธุ์ของ *V. cholerae* non-01 มีสมบัติทางเคมี และพันธุศาสตร์เหมือนกับ *V. cholerae* 01 แต่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงที่รุนแรงน้อยกว่า บางครั้งอาจถ่ายเป็นเลือดปน และบางครั้งอาการอาจรุนแรงคล้ายอหิวาต์ คนไข้ที่สัมผัสกับแหล่งน้ำมีรายงานว่าเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดและเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 134)

4.3 การรักษา

หลักการรักษาโรคติดเชื้อ cholera ที่สำคัญคือ การให้สารน้ำและเกลือแร่ทดแทนอย่างเพียงพอ เนื่องจากผู้ป่วยสูญเสียน้ำจากการถ่ายเหลวปริมาณมาก ในรายที่อาการไม่รุนแรงอาจให้ทางการกิน ในรายที่รุนแรงควรให้สารน้ำและเกลือแร่อย่างรวดเร็วทางเส้นเลือด การให้ยาต้านแบคทีเรียอาจช่วยลดระยะเวลาการดำเนินโรค ลดการสร้างสารพิษของเชื้อ ลดความรุนแรงของโรค และลดการแพร่เชื้อออกทางอุจจาระ แต่อาการของผู้ป่วยยังคงอยู่ในระยะหนึ่งจากสารพิษที่ได้ถูกสร้างขึ้นก่อนได้รับยา ยาหลักที่ใช้สำหรับการรักษาโรค ได้แก่ tetracycline, doxycycline. (ภัทรชัย กิริติสิน. 2549 : 102)

5. *Pseudomonas aeruginosa*

5.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง มีขนาดประมาณ 0.5 - 1×1.5 - 5 ไมครอน มักพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออาจเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ บางสาย

พันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ เชื้อเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่ส่วนปลายเซลล์ 1 เส้น บางสปีชีส์อาจมีมากกว่า 1 เส้น จัดอยู่ในกลุ่ม obligate aerobe แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ในบรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจน อุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30 - 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส เชื้อ *Pseudomonas* ให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase บางสปีชีส์สามารถสร้างเม็ดสี เชื้อ *Pseudomonas* สามารถสร้างเม็ดสี 4 ชนิด ที่พบได้บ่อย คือ pyocyanin และ pyoverdine ซึ่งทำให้หนองที่เกิดจากการติดเชื้อมีสีเหลืองเขียว (ภัทรชัย กิริตสิน. 2549 : 107)

5.2 การทำให้เกิดโรค

ในขณะที่ *Pseudomonas aeruginosa* ไม่ค่อยทำให้เกิดโรคในคนที่มีสุขภาพดี แต่จะเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรืออ่อนแอ หรือเมื่อเข้าสู่ร่างกายในบริเวณที่ไม่มีความต้านทานตามปกติ เช่น เยื่อเมือกและผิวหนังที่ถลอก ในคนไข้ในโรงพยาบาล จะมีการติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้ง่ายและรุนแรง โดยที่เชื้อเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือ หรือการใช้เครื่องสวนในหลอดเลือดหรือหลอดปัสสาวะ คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้ การติดเชื้อที่ตา คนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเนื่องจากสูงอายุ โรคที่ภูมิคุ้มกันถูกกด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว ทำให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายและเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดและปอดบวมตามมา การทำให้เกิดเชื้อก็โดยอาศัยปัจจัยต่างๆ เช่น พิไล เอนไซม์ และ ทอกซิน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 120)

5.3 โรคติดเชื้อจาก *Pseudomonas aeruginosa* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547 : 120)

5.3.1 การติดเชื้อในกระแสเลือด และเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ

การติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในกระแสเลือดไม่แตกต่างจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น แม้ว่าจะมีอัตราการตายสูงกว่า อาจเนื่องจากเชื้อมักติดเชื้อในคนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติ และเนื่องจากความรุนแรงของเชื้อเอง การติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จะพบในคนไข้ที่มีนิวโทรฟิลน้อยกว่าปกติ ส่วนใหญ่การติดเชื้อมักเริ่มจากระบบหายใจส่วนล่างทางเดินปัสสาวะ ผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อนๆ อาจเกิดรอยโรคที่ผิวหนังตอนแรกๆจะเป็นตุ่มน้ำใสที่ไม่เจ็บ 2 - 3 วันต่อมาจะขยายใหญ่และลุกลามเป็นสีม่วง และดำ เกิดเลือดออก และเกิดแผลเปื่อย การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบเชื้อจำนวนมากและพบการทำลายผนังหลอดเลือด

การเกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ พบในคนไข้ที่ให้ยาทางหลอดเลือดดำ โดยแหล่งของการติดเชื้ออยู่ที่เครื่องมือที่ปนเปื้อน มักทำให้เกิดอาการลิ้นหัวใจอักเสบและเรื้อรัง

5.3.2 การติดเชื้อที่ปอด (pulmonary infection)

การติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ทางเดินหายใจส่วนล่าง มีตั้งแต่หลอดคอและหลอดลม ปอดอักเสบ (tracheobronchitis) มีการรวมกลุ่มของเชื้อ จนถึงปอดอักเสบที่รุนแรง การติดเชื้อพบในคนไข้ที่เป็นโรคปอดเรื้อรัง และผู้ที่มีนิวโทรฟิลน้อยกว่าปกติ

5.3.3 การติดเชื้อที่หู (ear infection)

หูส่วนนอกอักเสบ ที่เกิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* มักพบในคนที่ชอบเล่นน้ำ และเชื้อลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นใน และเป็นอันตรายได้ จำเป็นต้องรักษาด้วยยาปฏิชีวนะและการผ่าตัด

5.3.4 การติดเชื้อที่แผลไฟไหม้

การรวมกลุ่มของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แผลไฟไหม้ จะทำให้เกิดการทำลายผนังหลอดเลือดและเกิดเนื้อเยื่อตาย จนทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด บริเวณผิวหนังที่ไหม้มีความชุ่มชื้น และไม่มีนิวโทรฟิลป้องกันการบุกรุก ทำให้เกิดการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ง่าย

5.3.5 การติดเชื้อที่อวัยวะอื่น

Pseudomonas aeruginosa เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่อวัยวะต่างๆ เช่น ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ตา ระบบประสาทส่วนกลาง ระบบกล้ามเนื้อและกระดูก การติดเชื้อ *Pseudomonas* จะต้องมีการติดเชื้อในแหล่งที่ขึ้นและคนไข้ไม่มีกลไกการติดเชื้อ เช่น เกิดบาดแผลที่ผิวหนัง การสูญเสียเชื้อประจำถิ่น เนื่องจากใช้ยาปฏิชีวนะจำนวนมากหรือเกิดภาวะนิวโทรฟิลน้อย การติดเชื้อในท่อปัสสาวะมักพบในคนไข้ที่ใช้เครื่องสวนหลอดปัสสาวะ

9. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการที่นิยมใช้ทดสอบมีดังนี้ (มาลิน จุลศิริ. 2540 : 84)

1. Dilution method เป็นวิธีการเจือจางสารต้านจุลชีพจากความเข้มข้นมากไปหาน้อย ในหลอดอาหารเหลวหรือในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบได้ชัดเจน จากนั้นใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารที่เตรียมไว้ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ดูผลการเจริญของเชื้อจากความขุ่นของอาหารในแต่ละหลอดหรือสังเกตโซนใสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและนำค่าที่ได้แปลเป็นผลการยับยั้งว่าอยู่ในระดับใด ตามการแบ่งของ NCCILS มี 3 ระดับ คือ Susceptible, Intermediate และ Resistant วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือ broth dilution test และ agar dilution test

ข้อดี ของ broth dilution test คือ ใช้ทดสอบวิธีการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารได้ให้ผลรวดเร็วมีขอบเขตการได้หลายรูปแบบ เช่น ภายหลังการบ่มระยะหนึ่งอาจตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเชื้อที่เกิดจากสารต้านจุลชีพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรืออาจตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข้อดีของ agar dilution test คือใช้ทดสอบเชื้อหลายชนิดที่ได้ในเวลาเดียวกัน ใช้ดูได้ว่าเชื้อที่ทดสอบมีการปนเปื้อนหรือไม่ รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมสารอื่นที่ทำให้ขุ่น เช่น เลือด สามารถทดสอบได้

2. Diffusion method คือการทดสอบโดยการให้สารต้านจุลชีพเข้าไปในเนื้อวุ้น แล้วดูการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่บนผิววุ้นหรือผสมลงในเนื้อวุ้น สารต้านจุลชีพที่ใส่อาจอยู่ในรูปของ disk คือการใช้กระดาษชุบสารต้านจุลชีพ ซึ่งนิยมใช้รูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หรืออยู่ในเม็ดคล้ายเม็ดยา อาจจะเจาะหลุมในวุ้นแล้วหยดสารต้านจุลชีพที่บริเวณใดก็จะไม่มีแบคทีเรียเจริญ เกิดเป็นวงว่าง เรียกว่า zone of inhibition การทดสอบโดยหลักการนี้มีใช้อย่างกว้างขวางมีอยู่ 2 วิธี คือ Disk diffusion method เป็นวิธีที่นำมาใช้สำหรับวัดปริมาณสารต้านจุลชีพที่ทราบปริมาณในรูปของ disk หรือ tablet วิธีที่ 2 คือ Agar diffusion method เป็นวิธีที่นำมาใช้สำหรับวัดปริมาณสารต้านจุลชีพจากแหล่งต่างๆ เช่น จากซีรัม ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง หรือตรวจปริมาณสารต้านจุลชีพเพื่อวัตถุประสงค์อื่น วิธีนี้สิ่งที่จะตรวจคือ สารต้านจุลชีพ ซึ่งจะใส่ในหลุม และแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ต้องทราบความไวแล้ว

ในที่นี้จะทำการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเฉพาะวิธีแรกที่เป็นวิธีการเจือจางสารต้านจุลชีพจากความเข้มข้นมากไปหาน้อยในหลอดอาหารเหลว

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในผักเบียร์ใหญ่ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แอลฟาโทโคเฟอรอล วิตามินซี สารประกอบฟีนอลิกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านไกลเคชั่น และฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย โดยทำการเปรียบเทียบสารสกัดที่สกัดจากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่ ได้แก่ ใบ ลำต้น ผลดิบ และดอก โดยดำเนินการวิจัยตามลำดับดังต่อไปนี้

1. แผนการวิจัย
2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง
3. วิธีดำเนินการวิจัย
4. การวิเคราะห์ข้อมูล
5. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

แผนการวิจัย

การดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง คือ (1) การเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน วิตามินซี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมถึงปริมาณกรดไขมันชนิดโอเมก้าสาม (2) การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (3) การศึกษาฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานและ (4) การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย โดยทดสอบกับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในกระเพาะอาหาร ในการทดลองครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน วิตามินซี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมถึงปริมาณกรดไขมันชนิดโอเมก้าสาม โดยศึกษาจากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่ ได้แก่ ใบ ลำต้น และดอก

การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่างๆของผักเบียร์ใหญ่ โดยทำการทดสอบด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1. DPPH radical scavenging activity
2. Hydroxyl radical scavenging activity
3. β -carotene-linoleate bleaching
4. Ferric reducing/antioxidant power
5. Total antioxidant capacity

การทดลองที่ 3 เป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านไกลโคเจนซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เหนียวทำให้เกิดโรคเบาหวาน โดยทดสอบจากสารสกัดที่สกัดได้จากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่

การทดลองที่ 4 เป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียโดยแบคทีเรียที่เลือกนำมาทดสอบในการทดลองครั้งนี้เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในกระเพาะอาหาร คือ *Samonella typhi* , *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* และ *Pseudomonas aeruginosa*

โดยการทดลองในครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) แต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ (Beaker)
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
3. ปิเปตต์ (Pipette)
4. ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
5. แท่งแก้วคนสาร
6. เครื่องชั่งละเอียด (0.0001)
7. หลอดทดลอง
8. เครื่อง Spectrophotometer (Spectronic Genesys 5)
9. เครื่อง Centifuge (Rotina 48 R)
10. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)(Binder)
11. เครื่อง Spectroflorometer (Jasco)
12. เครื่อง HPLC diode array detector (Shimadzu LC-20AC)
13. Column (Reverse phase C18, 5 μ m 4.6 x 250 mm, Japan)
14. เครื่อง GC (Shimadzu 17A)
15. Column (122 – 7032 DB – WAX ,30m x 0.25 mm, USA)
16. เครื่อง Rotary evaporator (Buchi)
17. เครื่อง freezer dry water bath
18. ตู้หม้อนึ่ง 37°C
19. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (National)
20. หลอด centrifuge Megnetic stirrer
21. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเบอร์ 4

22. Filter membrane 0.45 μm cellulose acetate (Whatman)
23. โถดูดความชื้น (desicator)
24. เครื่อง Vortex
25. เครื่องปั่นกวนระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)
26. เครื่องวัดสีในระบบอัตโนมัติ L, a*, b* (Chroma meter: Minolta CR-300)

สารเคมี

1. 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl , DPPH (Fluka)
2. Methanol (JT.Baker)
3. Butylatedhydroxyanisole, BHA (Fluka)
4. Ferric sulphate (Carlo erba)
5. Thiobarbituric acid (PA Panreac)
6. Sodium phosphate (Carlo erba)
7. 2-deoxyribose (Fluka)
8. Ethylenediaminetetra acetic หรือ EDTA (Fluka)
9. Hydrogen peroxide (Carlo erba)
10. Ferrous chloride (BDH)
11. Hydrochloric acid (Carlo erba)
12. Tween 20 (Fluka)
13. Ethanol (BDH)
14. β -Carotene linoleic acid (Fluka)
15. TPTZ (Fluka)
16. Ammonium molybdate
17. Potassium dihydrogen phosphate (Carlo erba)
18. Metaphosphoric(Merek)
19. Acetonitrile (BDH)
20. Hexane (BDH)
21. Standard vitamin E (α -tocopherol) (Fluka)
22. Standard β -carotene (Fluka)
23. Standard vitamin C (Fluka)
24. Standard phenolic acids (*p*-coumaric, gallic , benzoic , ferulic, gallic acid, caffeic, (+)-catechin) (Fluka)
25. Folin–Ciocalteu reagent (Fluka)

- 26. Bovine serum albumin (BSA) (Fluka)
- 27. D-fructose (Fluka)
- 28. Potassium phosphate (Fluka)
- 29. Petroleum ether
- 30. Ether
- 31. Chloroform

วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยโดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างผักเบี้ยใหญ่เก็บในพื้นที่จังหวัดมหาสารคามโดยปลูกในที่กลางแจ้ง

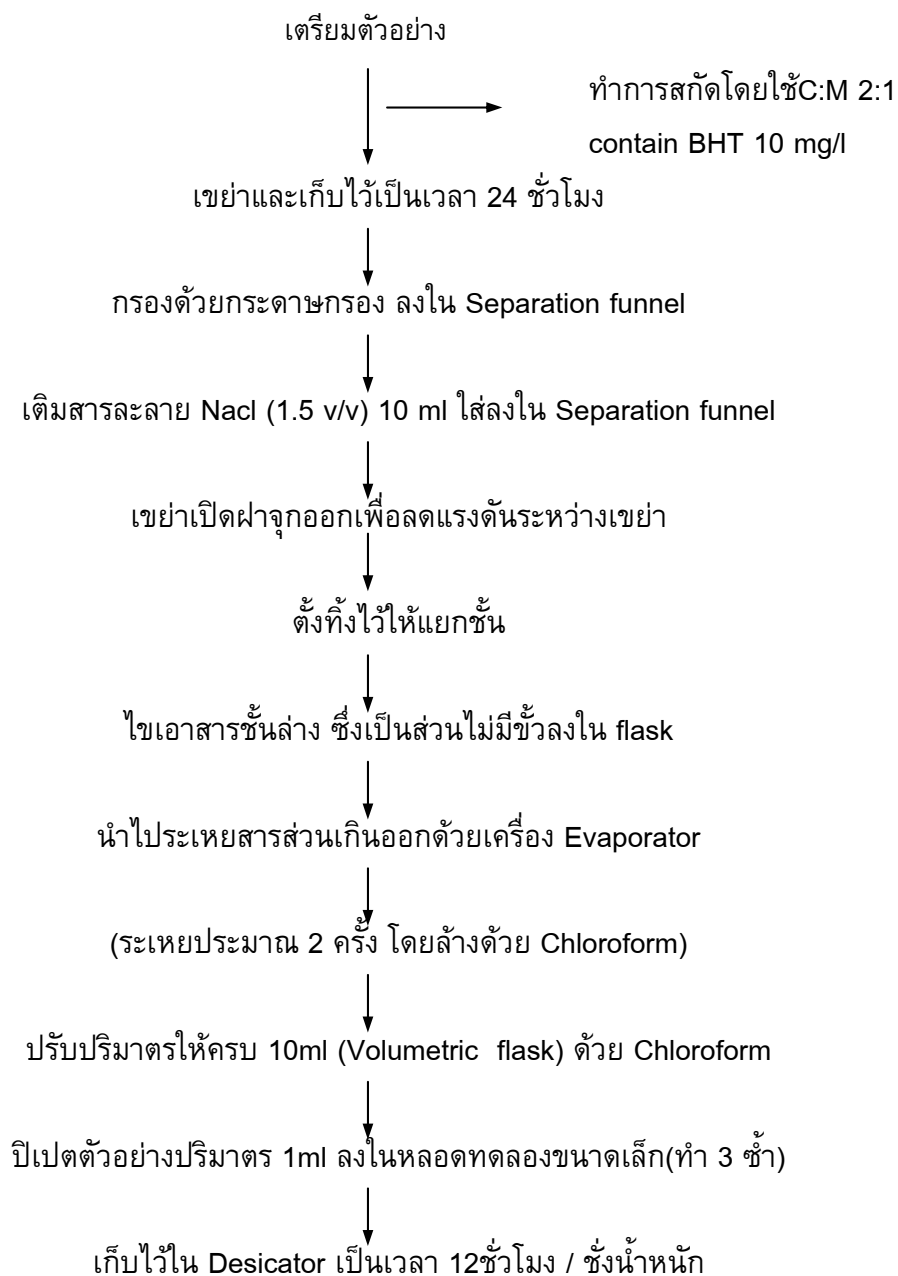
น้ำไม่ขัง



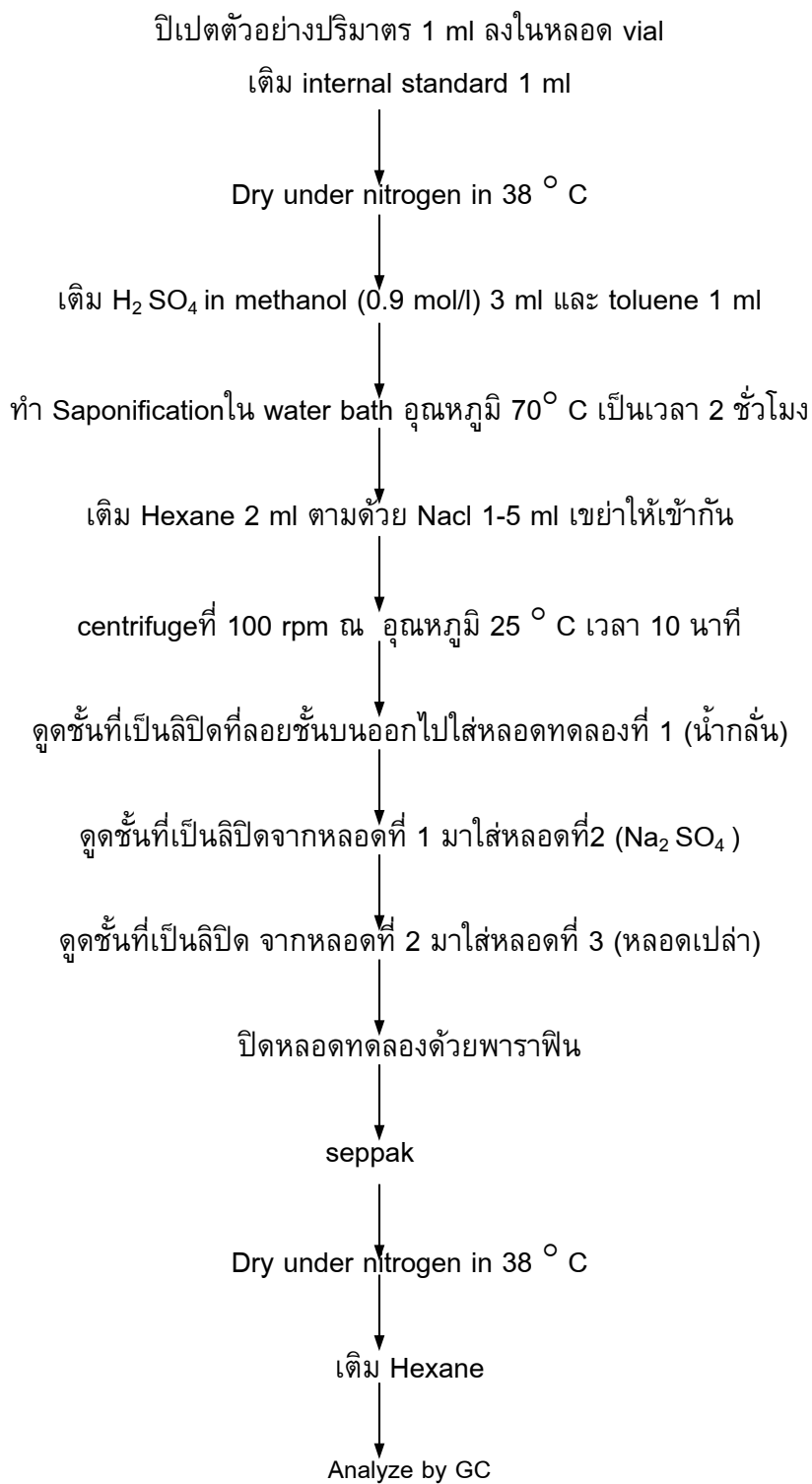
2. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆและกรดไขมันชนิดโอเมก้าสาม

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ (Lipid and chlorophyll content)



วิธีการวิเคราะห์กรดไขมัน



2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีน (β -carotene) จัดแปลงจาก Maria และค (2005 : 155-165)

การสร้างกราฟมาตรฐานของเบต้าแคโรทีน

ซึ่งสารละลายมาตรฐานด้วยน้ำหนักที่แน่นอน 10 มิลลิกรัม นำมาละลายในคลอโรฟอร์ม 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีนเป็น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลาย 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดย injection volume ครั้งละ 20 ไมโครลิตร แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ

การสกัดตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่าง 1 กรัม นำมาบดแล้วสกัดด้วยอะซิโตน 25 มิลลิลิตร นาน 25 นาที นำสารละลายที่สกัดได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) สกัดและกรองตัวอย่างซ้ำ อีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่กรองได้ ถ่ายลงสู่กรวยแยกแล้วเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 10-15 มิลลิลิตร ลงไปถ่าย pigment เข้าสู่เฟสปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยเจือจางอะซิโตนด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 5 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร สกัดเฟสอะซิโตนซ้ำด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 3 ครั้ง กรองส่วนสกัดของปิโตรเลียมอีเทอร์ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) ถ่ายลงขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ นำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนด้วยเครื่อง HPLC เฟสเคลื่อนที่เป็น acetonitril : dichlorometane : methanol (70 : 20 : 10) flow rate 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที

วิเคราะห์หาปริมาณสาร β -carotene ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 4.6 x 150 mm, 5 μ m ส่วนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitril : dichlorometane : methanol (70 : 20 : 10) flow rate 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดย UV – detector ความยาวคลื่น 454 นาโนเมตร

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Total Phenolic โดยวิธี Folin- Ciocalteus method (Zhou and Yu. 2004 : 1155-1162)

1. ปิเปตสารละลาย Gallic acid มาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน Folin- Ciocalteus reagent 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย sodium carbonate 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน Gallic acid

2. ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง อย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน Folin-Ciocalteus reagent 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาเติมสารละลาย sodium carbonate 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid เพื่อหาความเข้มข้นของ phenolic compound ในสารสกัดที่ทดลอง

2.4 การวิเคราะห์วิตามินซีด้วย HPLC (Abushita and others. 1997)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีโดยทำการชั่ง วิตามินซี 10 มิลลิกรัม มาละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร จะได้วิตามินซีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเจือจางความเข้มข้นเป็น 0.125 0.0625 0.3125 และ 0.01625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์แบบ external standard

สกัดตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างสดและใบอบแห้งมา 10 กรัม นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ในสารละลาย 2-metaphosphoric acid ความเข้มข้น 2% เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการเสถียรโครงสร้างวิตามินซีแล้วตีปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีแสงจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 3000 rpm จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 4 ตามลำดับ และกรองด้วย micro filter membrane ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร

วิเคราะห์วิตามินซี ด้วย HPLC .ใช้คอลัมน์ขนาด ขนาด 4.6 x 150 mm, 5 μ m ส่วนเฟสเคลื่อนที่(mobile phase) ประกอบด้วยเมทานอล และ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.1 โมล ทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของเมทานอลและ KH_2PO_4 (gradient) ตลอดการวิเคราะห์ โดยที่เวลาเริ่มต้นให้ เมทานอล : KH_2PO_4 (3:97) เป็นเวลา 5 นาที อัตราการไหลเป็น 0.75 มิลลิลิตร/นาที ไปเป็น 1 มิลลิลิตร/นาที ในนาทีที่ 8 โดยฉีดปริมาตร 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงโดย UV – diode array detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

2.5 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ด้วยเครื่อง HPLC ดัดแปลงจาก Dragovic-Uzelac และคณะ (2005 : 373-383)

1. การสกัดสารฟีนอลิก

ตัวอย่างสด 50 กรัม ผสมกับ เมทานอล: กรดไฮโดรคลอริก (100:1,v/v) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในที่มืด จากนั้นนำมากรองและ centrifuged ที่ 4000 rpm/min และนำส่วนของ supernatant มาระเหยด้วยเครื่องระเหย ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ทำการชะด้วย น้ำ:เอทานอล (80:20) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 โดยผ่าน anhydrous sodium sulfate จากนั้นนำไประเหยที่ ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส และปรับปริมาตรด้วย เมทานอล: น้ำ

(50:50, v/v) ให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปฉีดด้วยปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง HPLC

2. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC

การแยกสารประกอบด้วยเครื่อง HPLC โดยการใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 4.6 x 150 mm, 5 μ m ส่วนเฟสเคลื่อนที่(mobile phase) เป็นระบบ gradient เฟสเคลื่อนที่ A คือ น้ำ ประกอบด้วยกรดอะซิติก 3 เปอร์เซ็นต์ เฟสเคลื่อนที่ B ประกอบด้วย กรดอะซิติก 3 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตนไตร 25 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำ 72 เปอร์เซ็นต์ ในระบบ gradient ใน นาทีที่ 0-40 เฟสเคลื่อนที่ A 30 เปอร์เซ็นต์ เฟสเคลื่อนที่ B 70 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเคลื่อนไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นาทีที่ 40-45 เฟสเคลื่อนที่ A 20 เปอร์เซ็นต์ เฟสเคลื่อนที่ B 80 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเคลื่อนไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นาทีที่ 45-55 เฟสเคลื่อนที่ A 15 เปอร์เซ็นต์ เฟสเคลื่อนที่ B 85 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเคลื่อนไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที นาทีที่ 55-57 เฟสเคลื่อนที่ A 10 เปอร์เซ็นต์ เฟสเคลื่อนที่ B 90 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเคลื่อนไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ระบบการปฏิบัติงาน อุณหภูมิ คอลัมน์ 20 องศาเซลเซียส ปริมาตรในการฉีด 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงโดย UV –diode array detector ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3. วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ Dasgupta และ De (2006 : 471–474)

เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยดูถึงความสามารถในการจับ 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร ถ้าสารสกัดสามารถจับกับ DPPH radical ได้สีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

3.1.1 เตรียม 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล โดยการชั่ง DPPH 0.04 g /ml Ethanol ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมด้วยเครื่อง Vortex ปิดด้วยฟอยล์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3.1.2 ทดสอบตัวอย่างสารสกัดโดยดูดสารสกัดอย่างละ 0.1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง อย่างละ 3 หลอด จากนั้นเปิดสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ใส่หลอดที่ใส่สารสกัดตัวอย่างไปแล้วหลอดละ 3 ml เพื่อให้ทำปฏิกิริยากัน แล้วทำการเขย่า ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

3.1.3 ทดสอบตัวอย่างโดยการดูดสารสกัดที่ทำกรเตรียม และกรอง แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเป็น 5.00×10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 1.25×10^{-2} , 0.625×10^{-2} , 0.3125×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดและ DPPH ที่เตรียมมาทำปฏิกิริยากัน โดยการเปิดสารสกัดที่ทำกรเจือจางแล้วอย่างละ 0.1 มิลลิลิตรโดยทำ 3 ซ้ำ แล้วดูดสาร DPPH หลอดละ 3

มิลลิลิตรผสมในหลอดทำปฏิกิริยา ทั้งไว้ในที่มีเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

3.1.4 ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHA ที่ทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระเสถียร (DPPH) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร จะใช้ control คือสารละลายอนุมูลอิสระเสถียร (DPPH) และ blank คือเมทานอล

3.1.5 คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นแต่ละตัวอย่างแล้วนำมาแทนค่าในสูตรหาประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในพืชตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{SAMPLE}}) \times 100}{A_{\text{DPPH}}}$$

เมื่อ A_{DPPH} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง
 A_{SAMPLE} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

นำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระทั้ง 5 ความเข้มข้นในแต่ละตัวอย่างไปทำ Standard curve เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} ของแต่ละตัวอย่าง

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity ดัดแปลงจากวิธีของ Chung, Osawa และ Kawakishi (1997 : 118-123)

เป็นการยับยั้ง Hydroxyl radical ที่เกิดจากปฏิกิริยา fenton reation ในการสลายของสาร 2-deoxyribose โดยนำสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล และ สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล อย่างละ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย 2-deoxyribose ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เติมสารสกัดและ phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมล (pH 7.4) เพื่อให้ได้ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นเติม H_2O_2 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย trichloroacetic acid ความเข้มข้น 2.8 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา และเติมสารละลาย thiobarbituric acid ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เกิดสีเป็นการวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ hydroxyl radical นำไป ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ} = (A_0 - A_e) / A_0 \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีตัวอย่าง
 A_e = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β -carotene–linoleate bleaching ดัดแปลงจากวิธีของ Othman และคณะ (2007 : 1523–1530)

เป็นวิธีการวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวัดจากการฟอกสีของสาร β -carotene โดยการ นำสารละลาย β -carotene 1 มิลลิลิตร (0.2 มิลลิกรัมในคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร) สาร linoleic acid จำนวน 0.02 มิลลิลิตร และ สาร Tween 20 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปกลม เติมสารสกัด 0.2 มิลลิลิตรหรือสารละลายมาตรฐานหรือเอทานอล (ตัวควบคุม) ผสมให้เข้ากันนำไปประเหยเพื่อตั้งคลอโรฟอร์มโดยให้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำสารที่ได้มาเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บีบอัดสารละลาย 2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำร้อน อ่านค่าทุกๆ 20 นาที โดยการนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ BHT เป็นสารละลายมาตรฐาน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample or standard}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

oxidation rate ratio (R_{OR}) คำนวณได้จาก

$$R_{OR} = R_{\text{sample}}/R_{\text{control}};$$

3.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Strain (1996 : 70–76)

เป็นวิธีการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีหลักการว่า สารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอนจึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระเป็นความสามารถรวมในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridy triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (โอภาส วัชรคุปต์. 2549 : 62) โดยนำสารละลาย FRAP reagent ซึ่งเตรียมได้จากการนำ acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมล (pH 3.6) จำนวน 100 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลละลายใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมล จำนวน 10 มิลลิลิตร สารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล ในอัตราส่วน 10:1:1 และ เติมน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์เริ่มจากการนำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร น้ำกลั่น จำนวน 180 ไมโครลิตร และสารสกัดจำนวน 60 ไมโครลิตร หรือ สารละลายมาตรฐาน ใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย FRAP reagent เป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เพื่อหาความสามารถในการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การทำกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ นำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร น้ำกลั่น จำนวน 180 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในแต่ละความเข้มข้น (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมล) อย่างละ 60 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี total antioxidant capacity ดัดแปลงจากวิธีของ Dasgupta และ De (2004 : 219-224)

เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระ โดยนำสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่มา 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย sulfuric acid ความเข้มข้น 0.6 โมล sodium phosphate ความเข้มข้น 28 มิลลิโมล และ ammonium molybdate ความเข้มข้น 4 มิลลิโมล อย่างละ 1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร เปรียบเทียบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับ BHA และ วิตามินซี

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดไกลเคชั่น ดัดแปลงมาจาก Misur และ Turk (2001 : 155-165)

การทดสอบฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เหนียวทำให้เกิดโรคเบาหวาน โดยการทดสอบสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ในหลอดทดลอง สารที่ใช้ทดสอบคือ bovine serum albumin (BSA) กับ D-fructose ใน potassium phosphate buffer (pH 7.4) บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน การทดสอบทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น excitation ; 370 nm และ emission; 440 นาโนเมตร และใช้ Aminoguanidine เป็นตัวเปรียบเทียบในการยับยั้งไกลเคชั่น ความสามารถในการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่นคำนวณได้จาก

Inhibition (เปอร์เซ็นต์) = $100 - [\text{fluorescence intensity (sample)} - \text{fluorescence intensity (blank of sample)}] \times 100 / [\text{fluorescence intensity (control)} - \text{fluorescence intensity (blank of control)}]$

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

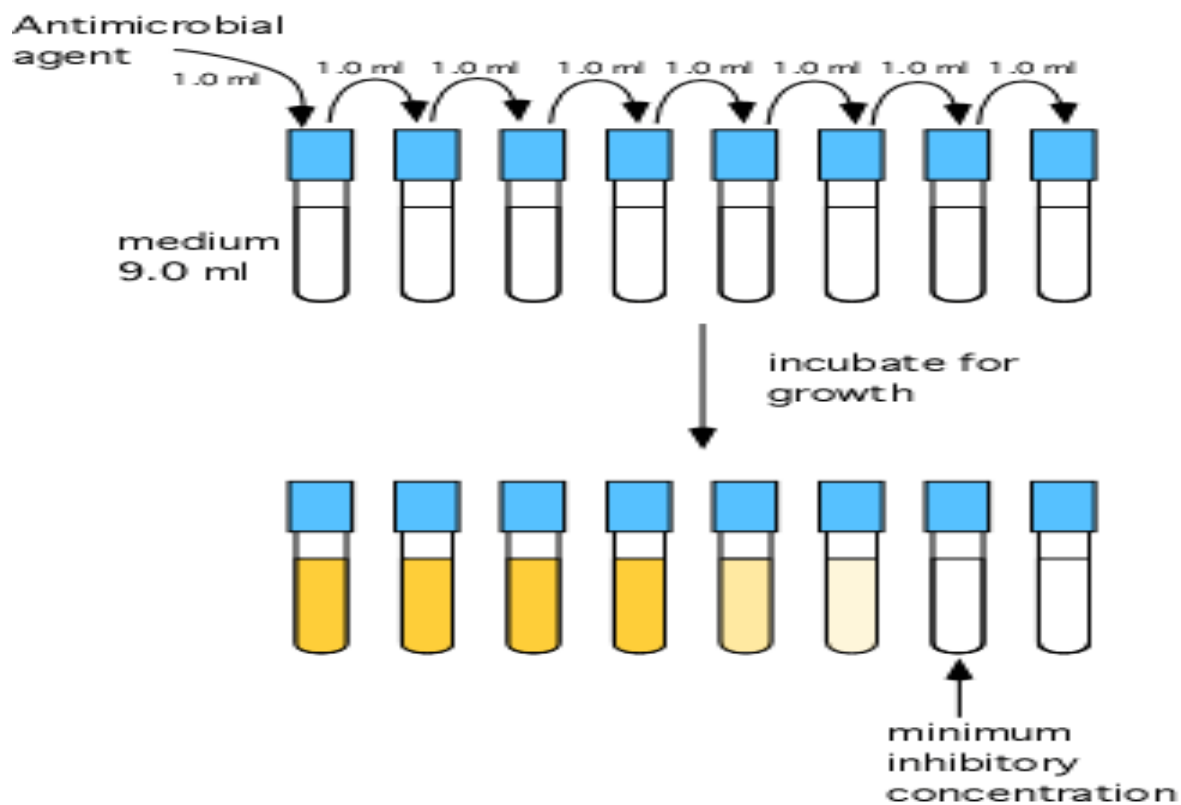
5.1 การเตรียมสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ ได้แก่ ใบ ลำต้น และดอก โดยวิธีแช่เยว (Maceration) (เมธิน ผดุงกิจ. 2542 : 17) นำส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ มาล้างให้สะอาด ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็ก นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อแห้งแล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า

5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย คือ *Samonella typhi* , *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella Pneumoniae*, *Vibrio cholerae* , *Pseudomonas aeruginosa* มาเลี้ยงในอาหาร Mueller-Hinton broth (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางแบคทีเรียด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ normol saline solution โดยปรับให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงหรือเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 (ภาคผนวก ก) เท่ากับจำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.3 การหาค่า MIC (Minimal inhibitory concentration) โดยวิธี Tube dilution method (Oonmetta-aree and others. 2006 : 1214-1220)

ทำการเจือจางสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ที่ทำการทดสอบ แล้วให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียโดยทำการเจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) โดยการเจือจางลงไปเรื่อยๆในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหาร Mueller-Hinton broth ให้มีปริมาณทั้งหมด 5 มิลลิลิตร และระดับ ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 และ 1:256 ตามลำดับ ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วย Normol saline solution 0.85% โดยปรับให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 เท่ากับจำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2 มา 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดที่ทำการเจือจางสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ไว้แล้ว และหลอดที่ทำการทดลองควบคุม 1 หลอดที่ไม่ได้เติมสารสกัด นำหลอดทดลองจากข้อ 3.3 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยตรวจดูว่าหลอดใดไม่มีความขุ่นของเชื้อโดยการขีดเชื้อ (Streak plate) เพื่อดูการยับยั้งการเจริญของเชื้อในแต่ละหลอดทดลอง



ภาพ 13 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิจัยครั้งนี้แบ่งการวิเคราะห์ข้อมูลออกเป็นดังนี้

1. นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. สรุปผลการวิเคราะห์และรายงานในรูปแบบตารางและกราฟ

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

สถิติที่ใช้ในการวิจัยข้อมูลดังนี้

1. สถิติพื้นฐาน ได้แก่

1.1 ค่าเฉลี่ย

1.2 ร้อยละ

1.3 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมุติฐานของการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านไกลโคเจน สถิติที่ใช้ F-test (One-way Analysis of Variance) และ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ ตามวิธีของ Scheffe ที่ระดับ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 12.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองผู้วิจัยได้ดำเนินการเสนอผลการทดลองตามลำดับ ดังนี้

1. ตอนที่ 1 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ ได้แก่ ใบ ลำต้น และดอก

1.1 ปริมาณไขมันและกรดไขมันชนิดต่างๆ

1.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

1.3 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน และวิตามินซี โดยรายงาน ผลการทดลองเป็น มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

2. ตอนที่ 2ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity รายงาน ผลการทดลองเป็นค่า IC₅₀ (50% Inhibition concentration) และค่า % scavenging

2.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity รายงาน ผลการทดลองเป็นค่า IC₅₀ (50% Inhibition concentration) และค่า % scavenging

2.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β -carotene-linoleate bleaching รายงาน ผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ

2.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) รายงานผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ

2.5 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Total antioxidant capacity รายงานผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ

3. ตอนที่ 3 ฤทธิ์การต้านไกลโคเจนในหลอดทดลอง

4. ตอนที่ 4 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ตอนที่ 1 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ ได้แก่ ใบ ลำต้น และดอก

1.1 ปริมาณไขมันและกรดไขมันชนิดต่างๆ

การศึกษาปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ (กรัม/100 กรัม ของน้ำหนักเปียก) จาก ส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ พบว่ามี ส่วนที่มีปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์มากที่สุดคือ ใบ (0.77 $\pm$ 0.07) รองลงมาคือ ดอก (0.75 $\pm$ 0.11) และลำต้น (0.44 $\pm$ 0.14) เป็นส่วนของผักเบี้ยใหญ่ที่

มีปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์น้อยที่สุด ดังแสดงในตาราง 5 ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์จากส่วนต่างๆของคุณนายตื่นสาย พบว่า ส่วนที่มีปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์มากที่สุดคือ ใบ (0.60 ± 0.13) รองลงมาคือ ลำต้น (0.42 ± 0.04) และ ดอก (0.31 ± 0.17) เป็นส่วนของผักเบี้ยใหญ่ที่มีปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์น้อยที่สุด (ตาราง 6)

ตาราง 5 ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ จากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่

ตัวอย่างส่วนของพืช	ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ (กรัม/100 กรัม ของน้ำหนักเปียก) ($\bar{X} \pm SD$)
ใบ	0.77 ± 0.07
ลำต้น	0.44 ± 0.14
ดอก	0.75 ± 0.11

ตาราง 6 ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ จากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่

ตัวอย่างส่วนของพืช	ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ (กรัม/100 กรัม ของน้ำหนักเปียก) ($\bar{X} \pm SD$)
ใบ	0.60 ± 0.13
ลำต้น	0.42 ± 0.04
ดอก	0.31 ± 0.17

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันโดยใช้เครื่อง Iatroscan (TLC/FID) ชนิดของไขมันที่พบ คือ Triacylglycerol , Phytosterol , Phospholipids และ Free fatty acid ซึ่ง Triacylglycerol เป็นองค์ประกอบของเป็นไขมันที่พบมากในทุกส่วนของผักเบี้ยใหญ่ พบมากที่สุดในส่วนของใบและลำต้น คือมีปริมาณ 67.65 ± 3.50 และ 67.03 ± 4.29 ตามลำดับ และดอก (17.09 ± 2.65) มีปริมาณน้อยที่สุด ปริมาณไขมันชนิด Phytosterol พบมากที่สุดที่ลำต้น (32.96 ± 4.29) รองลงมาคือ ดอก (14.95 ± 3.70) และส่วนที่มีปริมาณองค์ประกอบไขมันชนิด Phytosterol น้อยที่สุด คือ ใบ (9.60 ± 2.92) องค์ประกอบของไขมันชนิด Phospholipids พบมากที่สุดในส่วนของดอก (67.94 ± 3.55) แต่ไม่พบในลำต้น และ Free fatty acid พบเฉพาะในส่วนของใบ แต่ไม่พบในส่วนของลำต้นและดอก ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่โดยใช้เครื่อง latroscan (TLC/FID)

ส่วนของพืช	องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) ($\bar{X} \pm SD$)			
	TAG	PS	PL	FFA
ใบ	67.65 $\pm$ 3.50	9.60 $\pm$ 2.92	10.74 $\pm$ 0.72	11.98 $\pm$ 0.83
ลำต้น	67.03 $\pm$ 4.29	32.96 $\pm$ 4.29	ND	ND
ดอก	17.09 $\pm$ 2.65	14.95 $\pm$ 3.70	67.94 $\pm$ 3.55	ND

TGA = Triacylglycerol, PS = Phytosterol

PL = Phospholipids , FFA= Free fatty acid

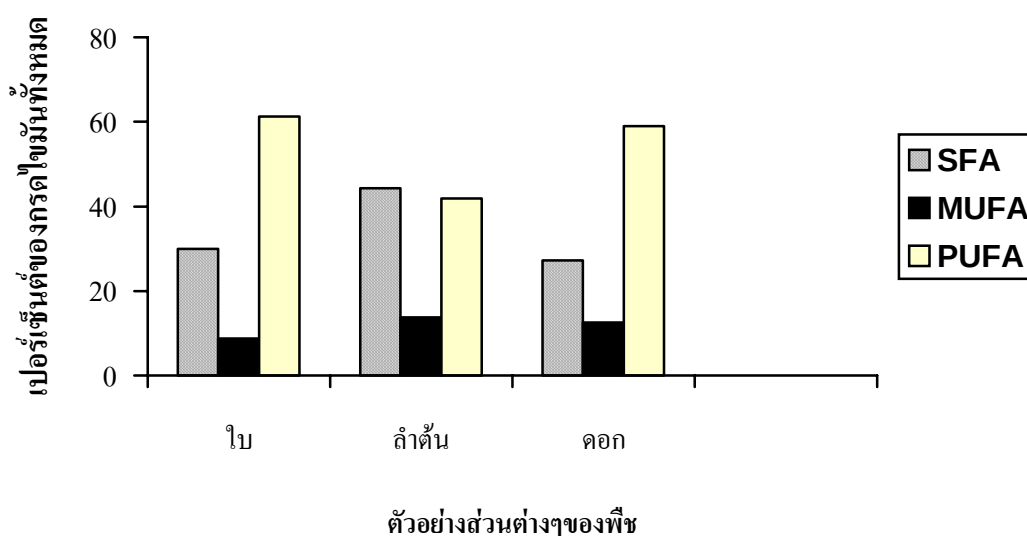
ND = ไม่สามารถตรวจพบ

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันจากส่วนต่างๆของคุณนายตื่นสายโดยใช้เครื่อง latroscan (TLC/FID) ชนิดของไขมันที่พบมากที่สุดคือ คือ Phospholipids เป็นองค์ประกอบของเป็นไขมันที่พบมากในทุกส่วนของคุณนายตื่นสาย พบมากที่สุดในส่วนของใบ คือมีปริมาณ 74.98 $\pm$ 3.61 และลำต้น (54.10 $\pm$ 4.16) มีปริมาณน้อยที่สุด ปริมาณไขมันชนิด Phytosterol พบมากที่สุด ใน ดอก(35.69 $\pm$ 1.33) รองลงมาคือ ลำต้น (41.07 $\pm$ 3.74) และส่วนที่มีปริมาณองค์ประกอบไขมันชนิด Phytosterol น้อยที่สุด คือ ใบ (11.42 $\pm$ 1.77) องค์ประกอบของไขมันชนิด Triacylglycerol พบมากที่สุดในใบ (7.31 $\pm$ 2.23) แต่ไม่พบในลำต้น และFree fatty acid พบเฉพาะในส่วนของใบ แต่ไม่พบในส่วนของลำต้นและดอก ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันจากส่วนต่างๆของคุณนายตื่นสายโดยใช้เครื่อง latroscan (TLC/FID)

ส่วนของพืช	องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) ($\bar{X} \pm SD$)			
	TAG	PS	PL	FFA
ใบ	7.31 $\pm$ 2.23	11.42 $\pm$ 1.77	74.98 $\pm$ 3.61	4.82 $\pm$ 0.62
ลำต้น	4.82 $\pm$ 0.62	41.07 $\pm$ 3.74	54.10 $\pm$ 4.16	ND
ดอก	4.97 $\pm$ 0.49	35.69 $\pm$ 1.33	59.33 $\pm$ 1.74	ND

จากการนำส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่มาสกัดหาองค์ประกอบของกรดไขมัน และความเข้มข้นของกรดไขมัน โดยใช้ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2 : 1) และนำไปวิเคราะห์กรดไขมัน โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography การวิเคราะห์หาองค์ประกอบและความเข้มข้นของกรดไขมัน จะต้องใช้สารมาตรฐานภายใน คือ Tricosanic acid (C23:0) โดยการฉีดสารมาตรฐานเข้าไปพร้อมกับสารตัวอย่าง และทำการคำนวณโดยใช้พื้นที่ใต้กราฟขององค์ประกอบกรดไขมัน เทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน จากการศึกษพบว่า องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ แบ่งได้ออกเป็นกรดไขมัน 3 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid ; SFA) กรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง (monounsaturated fatty acid ; MUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid ; PUFA) พบว่า ลำต้น(44.30±4.28) มีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวมากที่สุด รองลงมาคือ ใบ และดอกมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวน้อยที่สุด กรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุดในทุกส่วนของผักเป็ดใหญ่คือ palmitic acid (C16:0) รองลงมาคือ stearic acid (C18:0) myristic acid (14:0) arachidic acid (C20:0) margaric acid (C17:0) และpentadecanoic acid (C15:0) เป็นองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบน้อยที่สุด (ตาราง 7) กลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง (MUFA) จากการศึกษพบว่า ลำต้น (13.73±1.28) มีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิด MUFA มากที่สุด รองลงมาคือ ดอก (12.60±1.83) และใบ (8.83±2.68) มีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิด MUFA น้อยที่สุด กรดไขมันชนิด MUFA ที่พบมากที่สุด ในทุกส่วนผักเป็ดใหญ่คือ oleic acid (C 18:1) และ pentadecenoic acid (C15:1) เป็นกรดไขมันชนิด MUFA ที่พบน้อยที่สุด (ตาราง 7) กลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (PUFA) จากการศึกษพบว่าใบ (61.18±6.86) มีองค์ประกอบของ PUFA มากที่สุด รองลงมาคือ ดอก (59.04±2.50) และ ลำต้น (41.96±1.85) มีปริมาณกรดไขมันชนิด PUFA น้อยที่สุด (ตาราง 7) กรดไขมันชนิด PUFA ที่พบมากที่สุดคือ alpha-linolenic acid (C18:3n-3) และ Linoleic acid (C18:2n-6) ดังตาราง 9 และภาพ 14



ภาพ 14 ปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมันในผักเป็ดใหญ่

ตาราง 9 องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) จากส่วนต่างๆของ ผักเป็ดยักษ์

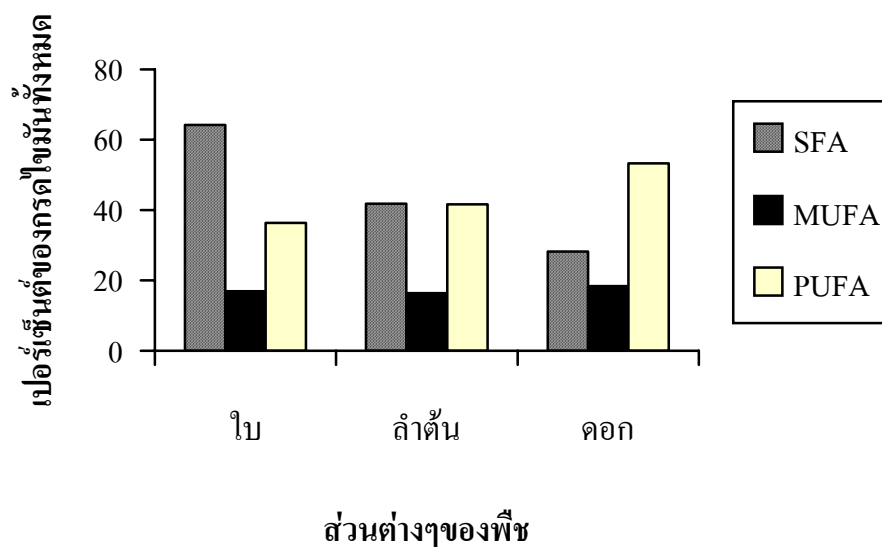
กรดไขมัน	ผักเป็ดยักษ์		
	ใบ	ลำต้น	ดอก
12:0	ND	4.75±0.72	ND
14:0	5.46±0.56	11.67±0.56	2.33±0.2
15:0	ND	0.87±0.13	0.25±0.18
16:0	16.69±1.43	20.20±1.99	18.79±0.64
17:0	ND	0.66±0.30	0.65±0.81
18:0	5.76±4.25	4.99±0.34	4.47±0.50
20:0	2.08±0.58	1.16±0.24	0.80±0.20
Total SFA	29.99±6.82	44.30±4.28	27.29±2.53
15:1	ND	0.34±0.09	0.10±0.06
16:1	2.90±0.88	0.93±0.12	0.47±0.19
18:1	3.89±1.17	8.42±0.16	11.36±1.13
20:1	2.01±0.63	4.04±0.91	0.77±0.45
Total MUFA	8.80±2.68	13.73±1.28	12.60±1.83
16:3n-3	6.44±3.86	0.76±0.42	ND
18:3n-3	46.13±0.94	23.14±0.54	32.20±1.03
Total n-3	52.54±4.80	23.90±0.96	32.20±1.03
18:2n-6	8.59±2.06	18.02±0.89	26.84±1.47
Total n-6	8.59±2.06	18.02±0.89	26.84±1.47
Total PUFA	61.13±6.86	41.92±1.85	59.04±2.50

จากการศึกษาพบว่า องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในส่วนต่างๆของคุณนายตื่นสาย แบ่งได้ออกเป็นกรดไขมัน 3 ชนิด เช่นเดียวกับผักเป็ดยักษ์ พบว่า ใบ (61.10±0.50) มีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้น และดอกมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อยที่สุด กรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุดในทุกส่วนของผักเป็ดยักษ์คือ palmitic acid (C16:0) รองลงมาคือ stearic acid (C18:0) (ตาราง 10) กลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง (MUFA) จากการศึกษพบว่า ดอก (18.39±0.75) มีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิด MUFA มากที่สุด รองลงมาคือ ใบ (17.00±0.03) และลำต้น (16.45±2.2) มีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิด MUPA น้อยที่สุด กรดไขมันชนิด MUPA ที่พบมากที่สุด ในทุกส่วนผักเป็ดยักษ์คือ oleic acid (C18:1) และ pentadecenoic acid (C15:1) เป็นกรดไขมันชนิด MUPA ที่พบน้อยที่สุด (ตาราง 10) กลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (PUFA) จากการศึกษพบว่าดอก (53.30±0.22) มีองค์ประกอบของ PUFA มากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้น (41.62±6.74) และ ใบ (36.31±0.28) มีปริมาณกรดไขมันชนิด PUFA น้อยที่สุด (ตาราง10) กรดไขมันชนิด PUFA ที่พบมากที่สุดคือ alpha-linolenic acid (C18:3n-3) และ Linoleic acid (C18:2n-6) ดังแสดงในตาราง 10 และภาพ 15

ตาราง 10 องค์ประกอบของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) จากส่วนต่างๆของ
 คุณนายตีนทราย

กรดไขมัน	คุณนายตีนทราย		
	ใบ	ลำต้น	ดอก
12:0	ND	2.27±0.69	0.36±0.01
14:0	ND	5.75±0.51	0.43±0.05
15:0	ND	0.52±0.20	0.65±0.18
16:0	54.04 ±0.46	26.95±2.56	21.50±0.60
17:0	ND	0.43±0.13	0.52±0.02
18:0	10.09±0.09	5.22±0.46	3.83±0.48
20:0	ND	0.73±0.35	0.94±0.20
Total SFA	64.10±0.50	41.87±4.90	28.23±1.54
15:1	ND	0.23±0.08	0.32±0.01
16:1	ND	1.35±4.90	0.74±0.15
18:1	17.00±0.03	11.52±3.60	14.58±0.33
20:1	ND	3.35±1.44	2.72±0.26
Total MUFA	17.00±0.03	16.45±2.2	18.39±0.75
16:3n-3	ND	ND	ND
18:3n-3	36.31±0.28	16.58±5.95	20.01±0.10
Total n-3	36.31±0.28	16.58±5.95	20.01±0.10
18:2n-6	ND	25.04±0.79	33.29±0.12
Total n-6	ND	25.04±0.79	33.29±0.12
Total PUFA	36.31±0.28	41.62±6.74	53.30±0.22

การหาปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมัน (Fatty acid concentration) ในผักเบี้ยใหญ่ และ
 คุณนายตีนทราย จากการศึกษพบว่า มีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 3
 กลุ่มคือ กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid : SFA) กรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง
 (Monounsaturated Fatty acid : MUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Poly unsaturated
 Fatty acid: PUFA) ใน กลุ่มของ SFA ของผักเบี้ยใหญ่มีปริมาณความเข้มข้น อยู่ในช่วง 295.07-
 478.85 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก ในกลุ่มของ MUFA ศึกษาพบว่า มีปริมาณความ
 เข้มข้นของ MUFA อยู่ในช่วง 95.27- 148.33 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก



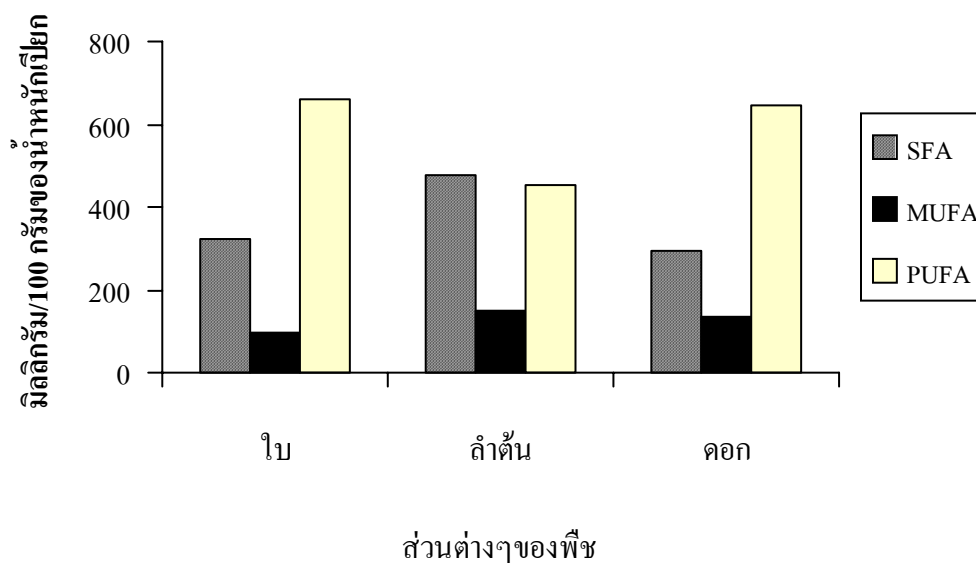
ภาพ 15 ปริมาณองค์ประกอบของกรดไขมันในคุณนายตีนทราย

ในกลุ่ม PUFA มีการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโอเมก้า-3 (Omega 3) และกลุ่มโอเมก้า 6 (Omega 6) ศึกษาพบว่า กลุ่มโอเมก้า 3 พบกรดไขมัน 2 ชนิดคือ กรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid ; C18:3n-3) และกรดไขมันไอโคซาเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid ; C20:5n-3) โดยกรดไขมันในกลุ่มของโอเมก้า 3 นี้ มีคุณสมบัติในการลดไลโปโปรตีน (Lipoprotein) ในตับและลดปริมาณคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ในเส้นเลือด เป็นการป้องกันการเกิดโรคความดันโลหิตสูง และโรคหัวใจ (Duo Li และคณะ, 2002) ในใบของผักเบี้ยใหญ่มีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลนิก 567.79 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก ส่วนความเข้มข้นของกรดไขมัน EPA ไม่พบในส่วนต่างของผักเบี้ยใหญ่ ในกลุ่มกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 6 ศึกษาพบกรดไขมัน 2 ชนิด คือ กรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2n-6) โดยกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 6 มีประโยชน์ต่อร่างกายสามารถลดระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ อีกทั้งยังเพิ่มระดับคอเลสเตอรอลชนิด HDL (High density lipoprotein) ในเลือด (เสก อักษรนุเคราะห์, 2540) ในดอกของผักเบี้ยใหญ่มีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก 92.78 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก **ดังตาราง**

ตาราง 11 ปริมาณความเข้มข้นของไขมัน (มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก) จากส่วนต่างๆ ของผักเป็ดใหญ่

กรดไขมัน	ผักเป็ดใหญ่		
	ใบ	ลำต้น	ดอก
12:0	ND	51.37±7.87	ND
14:0	59.04±6.07	126.09±41.29	25.24±2.84
15:0	ND	9.45±1.45	2.73±1.95
16:0	180.25±15.53	218.23±21.50	203.01±6.91
17:0	ND	7.13±1.09	7.04±1.79
18:0	62.27±5.89	53.95±3.72	48.32±5.49
20:0	22.50±6.29	12.63±1.13	8.73±2.25
SFA	324.06±45.44	478.85±18.46	295.07±8.44
15:1	ND	3.68±0.99	1.09±0.69
16:1	31.42±9.53	10.07±1.36	5.08±2.12
18:1	42.08±12.7	90.93±1.73	122.71±12.25
20:1	21.77±6.81	43.65±9.87	8.33±4.93
MUFA	95.27±5.36	148.33±7.63	137.21±11.53
16:3n-3	69.61±4.17	8.21±4.56	ND
18:3n-3	498.18±10.24	249.89±5.87	357.68±11.13
Total n-3	567.79±51.62	258.10±4.79	357.68±11.13
18:2n-6	92.78±12.33	194.06±9.63	289.92±15.96
Total n-6	92.78±12.33	194.06±9.63	289.92±15.96
PUFA	660.57±40.25	452.16±7.68	647.6±15.43

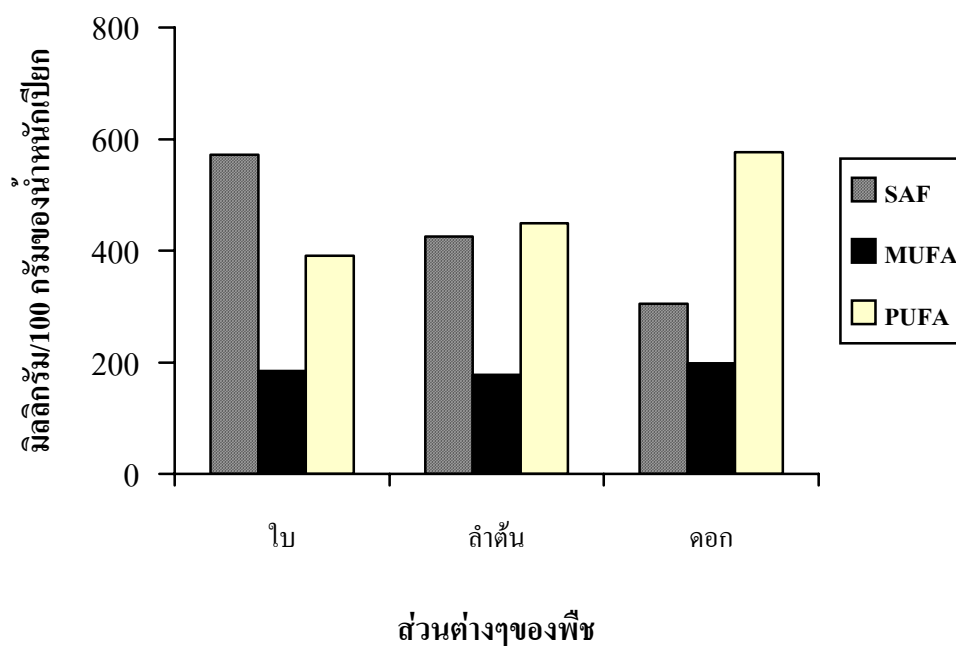
ปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมัน ในคุณนายตื่นสาย จากการศึกษพบว่า ใน กลุ่มของ SFA มีปริมาณความเข้มข้นของ SFA อยู่ในช่วง 305.70- 624.67 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก ในกลุ่มของ MUFA ศึกษาพบว่า มีปริมาณความเข้มข้นของ MUFA อยู่ในช่วง 177.95- 264.00 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก



ภาพ 16 ปริมาณความเข้มข้นของไขมันจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่

ตาราง 12 ปริมาณความเข้มข้นของไขมัน (มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักราช) จากส่วนต่างๆของคูนายตีนสาย

Fatty acids	คูนายตีนสาย		
	ใบ	ลำต้น	ดอก
12:0	ND	24.56±7.50	3.92±0.19
14:0	ND	62.14±5.58	5.19±0.56
15:0	ND	5.62±2.26	7.04±1.98
16:0	524.67±9.75	291.06±2.27	232.24±16.55
17:0	ND	4.68±1.19	5.68±0.28
18:0	100.09±0.90	56.43±5.06	41.44±5.19
20:0	ND	7.91±3.79	10.19±2.18
SFA	624.67±10.65	452.4±14.48	305.7±9.05
15:1	ND	2.56±0.94	3.53±0.12
16:1	ND	14.65±5.29	8.09±1.63
18:1	264.00±7.13	124.46±38.94	157.48±3.66
20:1	ND	36.28±5.62	29.39±2.83
MUFA	264.00±7.13	177.95±16.85	198.49±8.84
16:3n-3	ND	ND	ND
18:3n-3	315.00±11.28	179.06±12.27	216.17±1.16
Total n-3	315.00±11.28	179.06±12.27	216.17±1.16
18:2n-6	ND	270.46±8.58	359.51±1.39
Total n-6	ND	270.46±8.58	359.51±1.39
PUFA	315.00±11.28	449.52±25.32	576.68±11.01



ภาพ 17 ปริมาณความเข้มข้นของไขมันจากส่วนต่างๆของคุณนายตื่นสาย

ในกลุ่ม PUFA มีการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโอเมก้า-3 (Omega 3) และกลุ่มโอเมก้า 6 (Omega 6) ศึกษาพบว่า กลุ่มโอเมก้า 3 พบกรดไขมัน 2 ชนิดคือ กรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid ; C18:3n-3) และกรดไขมันไอโคซาเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid ; C20:5n-3) ในดอกของคุณนายตื่นสายมีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลนิก 216.17 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก และมีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก 359.51 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก ดังตาราง 12

1.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ พบว่าใบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้น และดอก มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด(ตาราง 13)

ตาราง 13 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ (mg GAE/100 g sample)

ส่วนของพืช	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
ใบ	24.12±0.15
ลำต้น	8.60±0.91
ดอก	5.69±0.86

ตาราง 14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆของคุดนัยตีนสาย (mg GAE/100 g sample)

ส่วนของพืช	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
ใบ	2.13±0.05
ลำต้น	2.34±0.11
ดอก	2.67±0.09

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆของคุดนัยตีนสาย พบว่าดอกมีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้น และใบ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด (ตาราง 14)

Total phenolic compound เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญตัวหนึ่ง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่า %radical scavenging โดยมีการแปรผันตามกันหากปริมาณ total phenolic compound มาก %radical scavenging จะมีค่ามากด้วยแต่ในตัวอย่างที่นำมาทำการทดลองพบว่าส่วนของดอกคุดนัยตีนสายมีปริมาณ total phenolic compound น้อยแต่มี %radical scavenging สูง และในส่วนใบผักเป็ดใหญ่มีปริมาณ total phenolic compound สูงแต่ค่า %radical scavenging น้อย เนื่องมาจากว่าสารออกฤทธิ์ที่พบในผักเป็ดใหญ่มีหลากหลายชนิดซึ่ง %radical scavenging ที่ทดสอบได้อาจเป็นการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น

การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ โดยใช้สารมาตรฐาน gallic acid, tannic acid, (+)-catechin, caffeic acid, *p*-coumaric, ferulic acid และ benzoic acid พบว่าทุกส่วนของผักเป็ดใหญ่ ตรวจพบตรวจพบสารฟีนอลิกคือ gallic acid, tannic acid, (+)-catechin โดยตรวจพบว่าในส่วนของใบมีปริมาณ gallic acid และ tannic acid มากที่สุดมีปริมาณ 21.01 และ 0.51 มิลลิกรัมต่อ 100 g น้ำหนักเปียก (+)-catechin acid พบมากที่สุด ดอก ปริมาณ 5.23 มิลลิกรัมต่อ 100 g น้ำหนักเปียก

ตาราง 15 ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัม/ลิตร)ในส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่

สารฟีนอลิก	ส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ ($\bar{X} \pm SD$)			รวม ($\bar{X} \pm SD$)
	ใบ	ลำต้น	ดอก	
gallic acid	21.01 $\pm$ 0.42	6.89 $\pm$ 0.89	10.97 $\pm$ 0.97	38.87 $\pm$ 1.90
tannic acid	0.51 $\pm$ 0.77	0.29 $\pm$ 0.20	0.29 $\pm$ 0.81	1.09 $\pm$ 1.78
(+)-catechin	2.54 $\pm$ 0.90	0.84 $\pm$ 0.35	5.23 $\pm$ 0.52	3.90 $\pm$ 1.77
caffeic acid	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric	ND	ND	ND	ND
ferulic acid	ND	ND	ND	ND
benzoic acid	ND	ND	ND	ND

ND = ไม่สามารถตรวจพบ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่าใบมีปริมาณของสารประกอบ ฟีนอลิกสูงสุด และได้วิเคราะห์สารกลุ่มฟีนอลิกโดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าในทุกส่วนของผักเป็ดใหญ่ มีปริมาณสารที่ต่างกัน แต่มีสารประกอบฟีนอลิกบางตัวไม่ สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นสาร ชนิดใด โดยปัจจุบันพบว่าสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ (โอภา วัชรคุปต์. 2549 : 123) จากการศึกษาระบาดวิทยาพบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องในการลดอัตราการเสี่ยงและเพิ่มอัตราป้องกันการเกิดโรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือด และโรคหัวใจรวมทั้งโรคอื่นๆ (โอภา วัชรคุปต์. 2549 : 123 ; Simopoulos. 2003 : 405-412 ; Kalirage and Dedoussis. 2007 : 99-109)

1.3 ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน และวิตามินซี

การวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน และวิตามินซีจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ พบว่า ใบ ใบเบต้าแคโรทีน มากที่สุด (58.00 $\pm$ 0.012) รองลงมาคือ ดอก (55.00 $\pm$ 0.048) และปริมาณสารเบต้าแคโรทีนพบน้อยที่สุดในส่วนของลำต้น (29.00 $\pm$ 0.089) ปริมาณวิตามินซีพบมากที่สุด ใบ (399.00 $\pm$ 0.79) รองลงมาคือ ดอกและลำต้น ดังแสดงในตาราง

ตาราง 16 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่

ส่วนของพืช	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักแห้ง) ($\bar{X} \pm SD$)	
	เบต้าแคโรทีน	วิตามินซี
ใบ	58.00±0.012	399.00±0.79
ลำต้น	29.00±0.089	227.00±0.68
ดอก	55.00±0.048	232.00±0.92

ND = ไม่สามารถตรวจพบ

ตอนที่ 2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity จากส่วนต่างๆ ของผักเบี้ยใหญ่แสดงผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ซึ่งความหมายของค่าดูดกลืนแสงคำนวณออกมาเป็น % radical scavenging ถ้าหากค่า % radical scavenging มีค่ามากแสดงว่าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากโดยเปรียบเทียบตัวอย่างกับสารมาตรฐาน คือ BHA ค่า %radical scavenging จากตัวอย่างส่วนต่างๆ ของผักเบี้ยใหญ่ค่าแตกต่างกัน ซึ่งส่วนที่มีค่ามากที่สุดคือ ดอก ลำต้น และใบ โดยมีค่าเท่ากับ 91.01 90.11 และ 76.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และได้เปรียบเทียบโดยใช้ค่าปริมาณความเข้มข้นของการยับยั้งสาร DPPH ได้ 50% (50% Inhibition concentration, IC₅₀) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p< 0.05) ซึ่งส่วนที่ยับยั้งได้มากที่สุดคือ ดอก ลำต้น และน้อยที่สุดคือ ใบ ดังแสดงในตาราง 17

ตาราง 17ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/ml)	% Inhibition $\pm$ SD	Regression equation(r) ^a	IC ₅₀ (mg/ml)
ใบ	0.1	13.71 $\pm$ 0.19	y = 14.715x + 10.412	0.10 $\pm$ 0.76 ^a
	0.2	48.59 $\pm$ 2.11	(r= 0.8612)	
	0.4	63.99 $\pm$ 1.07		
	0.8	69.78 $\pm$ 0.25		
	1.6	76.71 $\pm$ 0.42		
ลำต้น	0.1	28.53 $\pm$ 1.88	y = 16.799x + 14.725	0.08 $\pm$ 0.39 ^b
	0.2	43.34 $\pm$ 7.75	(r = 0.9177)	
	0.4	75.42 $\pm$ 2.67		
	0.8	88.18 $\pm$ 0.14		
	1.6	90.11 $\pm$ 0.45		
ดอก	0.1	47.76 $\pm$ 0.22	y = 9.9775x +48.29	0.006 $\pm$ 0.54 ^c
	0.2	76.01 $\pm$ 0.19	(r = 0.7678)	
	0.4	86.95 $\pm$ 0.09		
	0.8	88.95 $\pm$ 0.11		
	1.6	91.01 $\pm$ 0.09		

***a,b,c,...ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน จากแถวตั้งเดียวกันจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

ตาราง 18 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/ml)	% Inhibition $\pm$ SD	Regression equation (r) ^a	IC ₅₀ (mg/ml)
ใบ	0.1	1.20 $\pm$ 0.81	$y = 3.6885x + 26.44$ ($r = 0.9548$)	0.25 $\pm$ 0.08 ^b
	0.2	4.16 $\pm$ 0.36		
	0.4	6.50 $\pm$ 0.34		
	0.8	11.95 $\pm$ 1.13		
	1.6	14.91 $\pm$ 0.76		
ลำต้น	0.1	0.51 $\pm$ 0.50	$y = 4.6767 x + 16.976$ ($r = 0.9633$)	0.28 $\pm$ 0.04 ^a
	0.2	2.12 $\pm$ 0.89		
	0.4	3.71 $\pm$ 0.49		
	0.8	6.56 $\pm$ 0.11		
	1.6	8.54 $\pm$ 2.8		
ดอก	0.1	-19.02 $\pm$ 0.59	$y = 6.0792x + 14.135$ ($r = 0.9657$)	0.23 $\pm$ 0.05 ^c
	0.2	0.51 $\pm$ 0.12		
	0.4	5.77 $\pm$ 0.83		
	0.8	12.85 $\pm$ 0.90		
	1.6	23.93 $\pm$ 1.71		

***a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน จากแถวตั้งเดียวกันจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

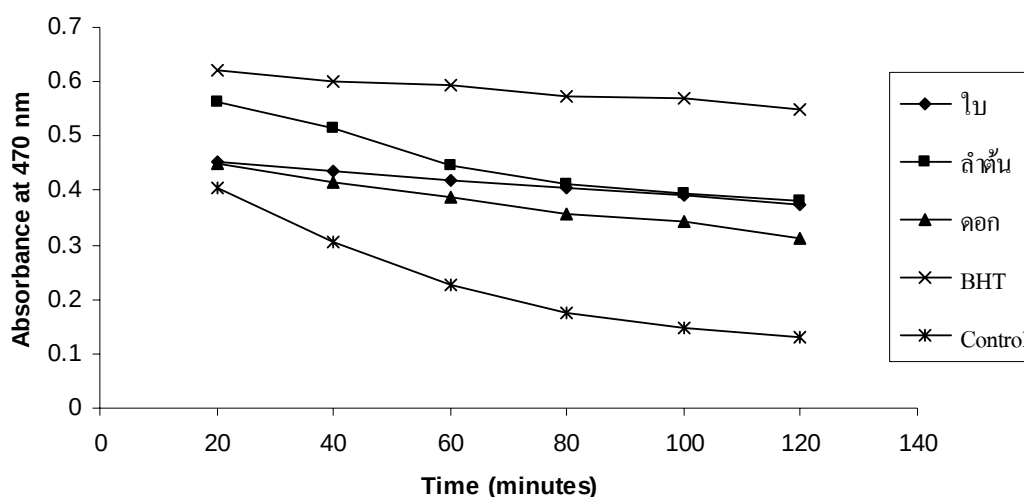
ตาราง 19 การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β -Carotene-linoleate bleaching

ตัวอย่าง	A_A^a	R_{OR}^b
ใบ	37.99 ± 0.27^b	0.62 ± 0.003^c
ลำต้น	22.67 ± 0.64^c	0.77 ± 0.006^b
ดอก	38.13 ± 1.19^a	0.61 ± 0.012^d
BHT	14.58 ± 0.28^d	0.854 ± 0.003^a

***a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน จากแถวตั้งเดียวกันจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

^a Antioxidant activity index.

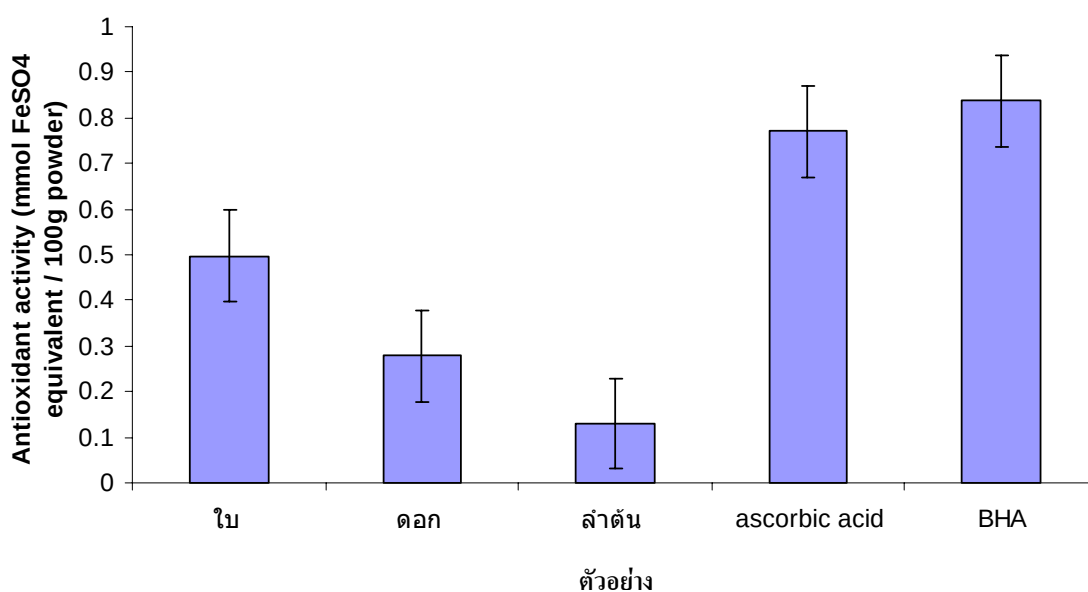
^b Oxidation rate ratio.



ภาพ 18 อัตราการ Degradation ของผักเบี้ยใหญ่ด้วยวิธี β -Carotene-linoleate bleaching

การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β -Carotene-linoleate bleaching ซึ่งเป็นวิธีการยับยั้งการฟอกสีของสาร β -Carotene จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากลำต้นผักเบี้ยใหญ่มีความสามารถในการลดการฟอกสีของสาร β -Carotene ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่นๆของผักเบี้ยใหญ่ (ตาราง 4) นอกจากนี้ยังพบว่า ในอัตราการ Degradation ของส่วนต่างของผักเบี้ยใหญ่นั้นในนาที่ที่ 20 ส่วนของใบและดอกมีความสามารถในการลดการฟอกสีได้ใกล้เคียงกัน เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง ใบจะมีความสามารถในการลดการฟอกสีได้ดีกว่าดอก ดังแสดงในภาพ 18

การวัดกิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP เป็นวิธีวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยตรง มีหลักการว่าสารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอน จึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระเป็นความสามารถรวมในการรีดิวซ์ วิธีนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยเลือดหรือสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร



ภาพ 19 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบของผักเบี้ยใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHA และ ascorbic acid มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากส่วนดอก และลำต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.497902, 0.278983 และ 0.129835 mmol FeSO₄/100 g น้ำหนักแห้ง

ตาราง 20 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Total antioxidant capacity

ตัวอย่าง	Equivlent to ascorbic acid (mg)/mg part of purslane	Equivlent to BHA (mg)/mg part of purslane
ใบ	0.458 ^c	0.157 ^b
ลำต้น	0.555 ^b	0.129 ^c
ดอก	0.909 ^a	0.285 ^a

***a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน จากแถวตั้งเดียวกันจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี Total antioxidant capacity ในสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่ ทำการวิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตรแล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีหน่วยเป็น (mg/mg) เปรียบเทียบกับ Standard curve ของ BHA และวิตามินซี ค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่า สารสกัดจากดอก มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (P<0.05) คือ 0.909 mg/mg รองลงมาคือ ลำต้น และ ใบตามลำดับ (0.555 และ 0.458 mg/mg ตามลำดับ)

ตาราง 21 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในวิธีที่แตกต่างกัน

	TPC	DPPH	Hydroxyl	FRAP	CLBA	TAC
TPC	1.00					
DPPH	0.711 ^{**}	1.00				
Hydroxyl	0.884 ^{**}	0.827 ^{**}	1.00			
FRAP	0.948 ^{**}	0.546	0.778 ^{**}	1.00		
CLBA	0.374	0.109	0.272	0.159	1.00	
TAC	0.269	-0.71	0.131	0.091	0.982 ^{**}	1.00

** Significantly correlated at $P<0.01$, $n=12$

TAC : Total antioxidant capacity

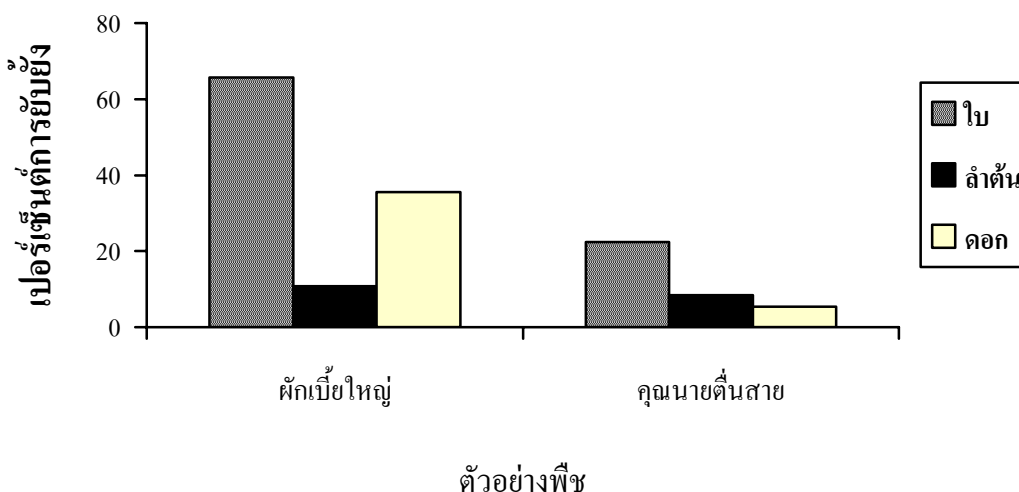
TPC : Total phenol content

CLBA: β -Carotene–linoleate bleaching assay

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในวิธีที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 16 พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์มากที่สุดกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ($R = 0.948$) รองลงมาคือ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging activity ($R = 0.884$) และ DPPH radical scavenging activity ($R = 0.771$)

ตอนที่ 3 ฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นในหลอดทดลอง

การศึกษาผลของฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นหรือปฏิกิริยาที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานในหลอดทดลองของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ พบว่า สารสกัดจากใบมีความสามารถในการต้านไกลเคชั่นดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน aminoguanidine รองลงมาคือ ดอกและลำต้น มีฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นได้น้อยที่สุด ผักเบี้ยใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งไกลเคชั่นได้ดีกว่าคุณนายตื่นสาย จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆมีฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพ 20 การเปรียบเทียบผลของการยับยั้งของสาร aminoguanidine และสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370/440 นาโนเมตร (excitation/emission)

ไกลเคชั่น เป็นสารเคมีที่เกิดจากโปรตีนและน้ำตาลซึ่งเป็นตัวอธิบายถึงการทำงานร่วมกันระหว่างสารไฮเปอร์ไกลเซเมียและเนื้อเยื่อหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับอายุรเวช ซึ่งมีปฏิกิริยากับกลุ่มโปรตีนเพื่อสร้าง cross-links ซึ่งปรากฏในผลลัพธ์ของปฏิกิริยาMaillard ซึ่งเป็นที่รู้จักในนามของ advanced glycation end-products หรือ AGEs

การสะสม “glycation hypothesis”ของ AGEs จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเนื้อเยื่อโปรตีนและลดความสามารถในการแตกตัว มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่ากระบวนการของ AGEs จะถูกเร่งโดย ไฮเปอร์ไกลซีเมีย การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางตัวสังเกตพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานและดูเหมือนจะเป็นกลุ่มคนที่มีอายุ ผู้ป่วยที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคเบาหวานและมีการแนะนำว่าโรคเบาหวานก่อให้เกิดการแก่ก่อนวัย อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่า AGEs จะเป็นปัญหาต่อกลุ่มคนที่เป็นโรคเบาหวานแต่ก็ยังพบเห็นในทุกคนแต่มีจำนวนน้อยซึ่งจะสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อปริมาณน้ำตาลในเส้นเลือดเพิ่มมากขึ้น AGEs จะถูกสร้างขึ้นเมื่อน้ำตาลในเส้นเลือดมีปริมาณสูงขึ้น เช่น หลังการดื่มน้ำโซดาหรือบริโภคอาหารที่มีน้ำตาลสูงสารเคมีชนิดนี้จะสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานและการทำลายที่เชื่อมโยงกับระบบของร่างกายและทำให้แก่ก่อนวัย (ลี โนว http://www.intrathailand.net/files/mess/mess_age.pdf)

ตอนที่ 4 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากผักเป็ดใหญ่ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Tube dilution

จากการทดลองนำสารสกัดจากผักเป็ดมาสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ เฮกเซน แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ *Samonella typhi* , *Eschercihia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimal inhibition concentration ; MIC) พบว่าสารสกัดที่สกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้ง *Samonella typhi* , *Eschercihia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และสารสกัดที่สกัดด้วย เฮกเซน สามารถยับยั้ง *Vibrio cholerae* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (1.66 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนสกัดที่ใช้ น้ำเป็นตัวสกัดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

ตาราง 22 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น
ปราศจากเชื้อ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ เฮกเซน ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้

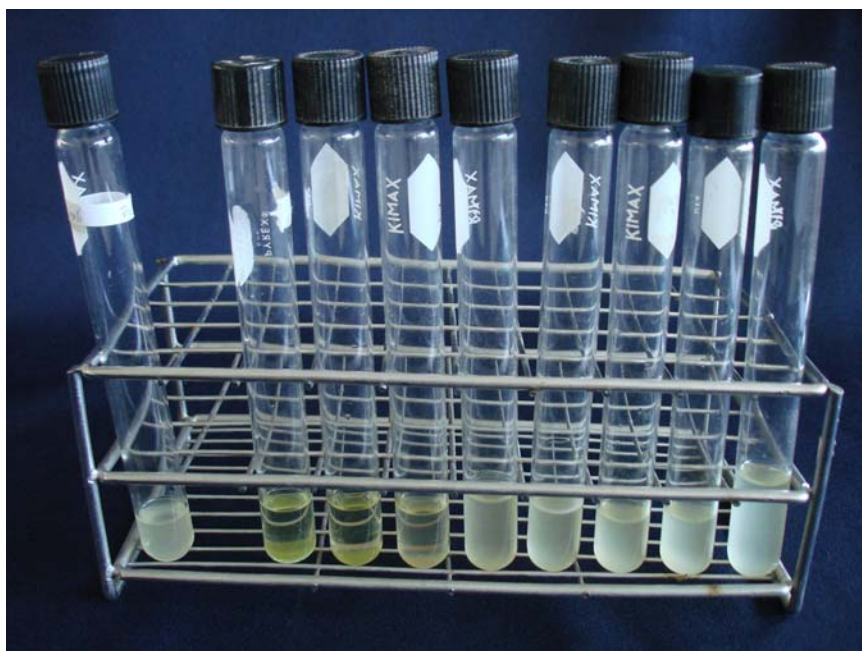
Bacterial strains	Minimum inhibitory concentration (MIC) (mg/ml)	
	95% ethanol	Hexane
<i>Samonella typhi</i>	1.25±0.06	2.08±0.72
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1.25±0.06	2.08±0.72
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	1.25±0.06	2.50±0.00
<i>Vibrio cholerae</i>	1.25±0.06	1.66±0.72
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.17±1.44	2.08±0.72

4.2 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Bactericidal concentration: MBC)

การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดจากผักเบี้ยใหญ่ที่สกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำการศึกษาได้ คือ *Samonella typhi* , *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae* และ *Vibrio cholerae* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 2.50 มิลลิกรัม/กรัม แต่พบว่า สารสกัดจากผลสุกที่สกัดด้วยเฮกเซน สามารถยับยั้งเชื้อ *Samonella typhi* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 2.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตาราง 23 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียจากการทดสอบสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ เฮกเซน ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้

Bacterial strains	Minimum bacteriocidal concentration (MBC) (mg/ml)	
	95% ethanol	Hexane
<i>Samonella typhi</i>	2.50±0.15	2.50±0.00
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2.50±0.15	4.17±1.44
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	2.50±0.15	4.17±1.44
<i>Vibrio cholerae</i>	2.50±0.15	3.33±1.44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.33±1.44	4.17±1.44



ภาพ 21 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากผักเบี้ยใหญ่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Tube dilution



ภาพ 22 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียจากสารสกัดจากผักเบี้ยใหญ่

บทที่ 5

สรุป

การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน องค์ประกอบของกรดไขมัน และปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันจากส่วนต่างๆของผักเป็ดใหญ่และคุณนายตื่นสาย พบว่า ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ของผักเป็ดใหญ่พบมากที่สุด ใบ มีค่าเท่ากับ 0.77 กรัม/100 กรัม น้ำหนักเปียก ลำต้นมีปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์น้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.44 กรัม/100 กรัม น้ำหนักเปียก ปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์ของคุณนายตื่นสายพบมาก ใบ มีค่าเท่ากับ 0.60 กรัม/100 กรัม น้ำหนักเปียก และดอกมีปริมาณไขมันและคลอโรฟิลล์น้อยที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.31 กรัม/100 กรัม น้ำหนักเปียก และการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันโดยใช้เครื่อง latroscan (TLC/FID) ชนิดของไขมันที่พบมากที่สุดคือ ฟอสฟอลิปิด พบมากในส่วนใบของใบมีปริมาณ 74.98 เปอร์เซ็นต์ในใบคุณนายตื่นสาย

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน ในกลุ่ม SFA พบว่าในผักเป็ดใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 27-44 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด คุณนายตื่นสาย มีค่าอยู่ในช่วง 28-64 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันที่พบมากที่สุดในกลุ่ม SFA คือ กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดไขมันในกลุ่ม MUFA พบว่าในผักเป็ดใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 8-13 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด คุณนายตื่นสาย มีค่าอยู่ในช่วง 16-18 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด พบมากที่สุดคือ Oleic acid พบ กรดไขมันกลุ่ม PUFA พบว่าในผักเป็ดใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 41-61 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด คุณนายตื่นสาย มีค่าอยู่ในช่วง 36-53 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในกลุ่ม PUFA คือ กรดลิโนเลอิก (C18:2) และ กรดลิโนเลนิก (C18:3) ผักเป็ดใหญ่องค์ประกอบไขมันที่มีความจำเป็นมากกว่าคุณนายตื่นสาย

การหาปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมัน (Fatty acid concentration) ในผักเป็ดใหญ่ กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid : SFA) และ ในกลุ่มของ MUFA มีปริมาณความเข้มข้นของ MUFA อยู่ในช่วง 295-478 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก และ 95-137 กรัมของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ ปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมัน ในคุณนายตื่นสาย กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid : SFA) และ ในกลุ่มของ MUFA มีปริมาณความเข้มข้นของ MUFA อยู่ในช่วง 305-557 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก และ 177-198 กรัมของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ

ในกลุ่ม PUFA มีการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโอเมก้า-3 (Omega 3) และกลุ่มโอเมก้า-6 (Omega-6) ใบของผักเป็ดใหญ่มีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลนิก 567.79 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก และ กรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 6 พบมาก ในดอกของผักเป็ดใหญ่มีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลอิก 289.92 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก แต่ไม่พบปริมาณความเข้มข้นในส่วนใบของกรดไขมันอะราชิโดนิก ใน

ผักเบี้ยใหญ่ ในคุณนายตื่นสายมีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลนิก 216 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียกในดอก และ กรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 6 พบมาก ในดอกของผักเบี้ยใหญ่มีปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไลโนเลนิก 359 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักเปียก

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากผักเบี้ยใหญ่ พบว่า สารสกัดจากดอกของผักเบี้ยให้มีความสามารถมากที่สุด โดยการศึกษาการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity, Hydroxyl radical scavenging activity และ Total antioxidant capacity รวมทั้งมีปริมาณประกอบฟีนอลิกมากที่สุด สารสกัดจากใบมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดด้วยวิธี β -Carotene-linoleate bleaching และวิธี FRAPการทดสอบฤทธิ์การต้านไกลโคเจนจากส่วนต่างๆ พบว่าใบมีความสามารถในการต้านฤทธิ์ไกลโคเจนมากที่สุด

การศึกษาการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ, เอทิลแอลกอฮอล์ 95%, เอ็กเซน โดยทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Samonella typh* , *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* ตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibition concentration: MIC) และตรวจสอบความเข้มข้นต่ำสุดของของเชื้อจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration: MBC) พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆของผักเบี้ยใหญ่ที่สกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์ เอ็กเซน

บรรณานุกรม

- ศิริวรรณ สุทธิจิตต์ (2544) ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อสุขภาพ โรงพิมพ์ดาว เชียงใหม่
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภัทรชัย กীরติสิน. 2549. วิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- มาลิน จุลศิริ. 2540. ยาด้านจุลชีพ: ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540 .209
- เมธิน ผดุงกิจ. 2542. ผลของบัวบก (Centella asiatica (Linn.) Urban) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสองชนิดที่ก่อโรคผิวหนัง. วิทยานิพนธ์ วท.ม. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- ระศักดิ์ สามี. 2548. “แคโรทีนอยด์ : โครงสร้างทางเคมีและกลไกที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของร่างกาย,” SWU Journal of Pharmaceutical Sciences. 10(1) : 58-66.
- สุจิตรา วีรวรรณ, อมรศรี ชุณหะวัณ และศรีสุภลักษณ์ สิงคาลวณิช. 2539. โรคผิวหนังเด็ก. กรุงเทพฯ : โฮลสติก พับลิชชิง.
- ศิริธร ศิริอมรพรรณ. 2548. “สารอาหารและผลกระทบจากการแปรรูป,” ใน เอกสารคำสอนวิชาคุณค่าทางโภชนาการอาหารกับผลกระทบทางเทคโนโลยี. หน้า 142. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- ศิริวรรณ สุทธิจิตต์ และไมตรี สุทธิจิตต์. 2543. โภชนาการสาร. 25(3) : 65-71.
- ศิริพรรณ วงศ์วานิช. 2538. การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียในอากาศในห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- ศรีนวล เจียจันทร์พงษ์. 2534. “การป้องกันผิวหนังเหี่ยวแห้ง,” อาหารและสุขภาพ. 5(30) : 66-65.
- โอภา วัชรคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ : พี.เอส.พรินท์.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C. and Flores-Saenz, J.L.(1998). Study of the Anti-Hyperglycemic Effect of Plants Used in Antidiabetics. Journal of Ethnopharmacology 61: 101-110.
- Almazan, A.M. and Adeyeye, S.O.(1998) . Fat and fatty acid concentrations in some green vegetables. Journal of Food composition and analysis. 11: 375-380.
- Ahmed, N. 2005. “Advanced Glycation Endproducts—Role in Pathology of Diabetic Complications,” Diabetes Research and Clinical Practice. 67 : 3–21.

- Benzie, I.F.F. and J.J. Strain. 1996. "The Ferric Reducing Ability of Plasma as a Measure of "Antioxidant Power" the FRAP Assay," Analytical Biochemistry. 239 : 70–76.
- Chen, M.H. and Berman, C.J. 2003. A Rapid Procedure for Analyzing Rice Bran Tocopherol and γ -oryzanol Contents. Food Composition and Analysis.
- Child, N. 2001. *Rice Outlook*: U.S. Rice Market Faces Record Supplies, Low World Prices. In:Electronic Outlook Report RCS-1201, US Department of Agriculture.
- Chung, S., T. Osawa and S. Kawakishi. 1997. "Hydroxyl Radical-Scavenging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*)," Bioscience Biotechnology Biochemistry, 61(1) : 118-123.
- Dasgupta, N. and B. De. 2004. "Antioxidant Activity of *Piper betle* L. Leaf Extract in Vitro," Food Chemistry. 88 : 219-224.
- _____. 2006. "Antioxidant Activity of Some Leafy Vegetables of India : A Comparative Study," Food Chemistry. 101 : 471–474.
- Dragovic-Uzelac, V., Pospišil, J., Levaj, B. & Delonga, K. 2005. The Study of Phenolic Profiles of Raw Apricots and Apples and Their Purees by HPLC for the Evaluation of Apricot Nectars and Jams Authenticity. Food Chemistry, 91(2): 373-383.
- Gens, H. J. de., Aidos, I., Boer, J. de, Luten, JB. And Brinkman, U.A. Th. 2001. Journal of Chromatography A. 910: 95-103
- Grover, J.K. , Yadav, S., and Vats ,V. .(2002). Medicinal Plants of India with Anti-Diabetic Potential. Journal of Ethnopharmacology 81 : 81-100
- Gunstone, FD, Harwood, JL and Padley, FB (eds) (1994) *The Lipid Handbook* (2nd edn), Chapman&Hall , LondonLi, D. and others. 2003. "Omega-3 (n-3) Fatty acids," in Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals. F.D GunStone (ed). p. 225-262. England : The oily press.
- Kim, H.Y. and Kim, K. (2003) Protrin Glycatio Inhibitory and Antioxidative Activities of Some Plant Extracts in Vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51, 1586-1591
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. 2007. Evaluation of The Ability of Antioxidants to Counteract Lipid Oxidation: Existing Methods, New Trends and Challenges. Progress in Lipid Research, 46(5): 244-282.
- LFAR (2000) Functional Food Markets, Innovation and Prospects. A Global Analysis,

LFAR, Leatherhead.

- Li, D (1998) Diet and vascular disease. *PhD. Thesis*. RMIT University. Australia
- Li, D., Bode, O, Drummond, H and Sinclair, AJ. (2003) *Omega-3 (n-3) fatty acids*. Pp 225-262. In *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*. F.D GunStone (ed). The oily press. England
- Li, D, Sinclair, A, Wilson, A., Nakkote, S., Kelly, F., Abedin, L., Mann, N and Turner, A (1999). Effect of Dietary α -Linolenic Acid on Thrombotic Risk Factors in Vegetarian Men. *American Society for Nutrition*. 69:872-82
- Liu, L., Howe, P., Zhou, YF, Xu, Z.Q, Hocart, C and Zhang, R. (2000). Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *Journal of Chromatography A*. 893:207-213.
- Lorgeril, M and Salen, P (2004). Alpha-Linolenic Acid and Coronary Heart Disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 14: 162-169
- Maria, E. and others. 2005. "Effect of Sodium Chloride, Acetic Acid, and Enzymes on Carotene Extraction in Carrots (*Daucus carota* L.)," *Journal of Food Science*. 70 : S136-E142.
- Nakkote, S, Li, D, Turner, A, Mann, N and Sinclair, A. 1999. Effect of Fish Oil Supplementation on Thrombotic Factors in Healthy Females. *J. of Mahidol*. 6(2) : 89- 94
- Obied, W.A., Mohamoud, E.N. and Mohamed, O.S.A. 2003. *Portulaca Oleracea* (Purslane): Nutritive Composition and Clinico-Pathological Effects on Nubian Goats. *Small ruminant Research*. 48: 31-36.
- Oonmetta-aree, J. and others. 2006. "Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galangal* Linn.) on *Staphylococcus aureus*," *LWT- Food Science and Technology*. 39 : 1214-1220.
- Ortega, H. and others. 2004. "Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Different Lipid-Soluble Antioxidants in Human Plasma and Low Density Lipoproteins," *Journal of Chromatography*. 803 : 249-255.
- Othman, A. and others. 2007. "Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans," *Food Chemistry*. 100 : 1523–1530.
- Pereira, J.A. and others. 2007. "Walnut (*Juglans regia* L.) Leaves: Phenolic Compounds, Antibacterial Activity and Antioxidant Potential of Different Cultivars," *Food and Chemical Toxicology*. 45 : 2287–2295.

- Renaud, S. and Nordoy, A.(1983). Small is Beautiful: Alpha-Linolenic and Eicosapentaenoic Acids in Man. *Lancet* I: 1169.
- Pereira C., Li D. and Sinclair, AJ (2001). The Alpha-Linolenic Acid Content of Green Vegetables Commonly Available in Australia. *Int. Journal Vitamin Nutrition*. 130, 2434-2443
- Saldeen, K. and T. Saldeen. 2005. "Importance of Tocopherols Beyond a-Tocopherol : Evidence from Animal and Human Studies," *Nutrition Research*. 25 : 877-889.
- Simopoulos, AP, Norman, H.A., Gillipsy, J.E. & Duke, JA. 1992. Common Purslane: A Source of Omega-3 Fatty Acid and Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*. 11: 374-382.
- Simopoulos, A.P., A. Leaf and N. Salem. 2000. "Workshop on the Essentiality and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acid," *Nutrition Today*. 35(5) : 166-167.
- Simopoulos, P.A. 2003. "Omega-3 Fatty Acids and Cancer," *Indoor and Built Environment*. 12 : 405-412.
- Sinclair, A.J. and others. 1992. "The Lipid Content and Fatty Acid Composition of Commercial Marine and Fresh Water Fish And Mollusks From Temperate Australian Waters," *Australian Journal Nutrition Diet*. 49 : 77-83
- Sinclair, A.J. and others. 1998. "The Omega-3 Fatty Acid Content of Canned, Smoked and Fresh Fish in Australia," *Australian Journal Nutrition Diet*. 55 : 116-120.
- Siriamornpun, S. and others. 2005 A. Essential Fatty Acid in Seeds and Vegetables in Thailand. Proceeding of 1st International Conference on Natural Product for Health and Beauty 2005. Takasila, Mahasarakham. p.162.
- _____. 2005 B. "Thai Jute Seed Oil : A Potential Polyunsaturated Fatty Acid Source," *Songklanakarin Journal Science Technology*. 27(4) : 17-21.
- _____. 2005c . Essential Fatty Acid in Seeds and Vegetables in Thailand. Proceeding of 1st International Conference on Natural Product for Health and Beauty 2005. Takasila, Mahasarakham. In press.
- Trouillas P, Calliste CA, Allais DP, Simon A, Marfak A, Delage C, Duroux JL . 2003. Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-proliferative Properties of Sixteen Water Plant Extracts Used in the Limousin Countryside as Herbal Teas. *Food Chemistry*. 80: 399-407.

- Young, J. 2003. "Introduction to Functional Food," Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals. F.D GunStone (ed). p 1-24. England : The Oily Press.
- Zhou, K. and L. Yu. 2006. "Total Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Commonly Consumed Vegetables Grown in Colorado," Lebensmittel-Wissenschaftund-Technologie. 39 : 1155–1162.
- .

ภาคผนวก

ผลสัมฤทธิ์ (Output)

1. งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

The 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty

December 17-19, 2008 , Naresuan University ,Phayao

เรื่อง “ Omega -3 fatty acid contents and phenolic acids of Thai purslane

(*Portulaca oleracea*)” และ “Higher contents of essential fatty acid and

omega-3 fatty acids in Thai edible plants”

2. วิทยากรถ่ายทอดวิชาการในการประชุมเชิงปฏิบัติการ หัวข้อเรื่อง Natural Antioxidant

วันที่ 17-21 ตุลาคม 2550 ณ ห้องประชุมและห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ ในเครือข่ายนักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีเกษตร ภาควิชา

ตะวันออกเฉียงเหนือ

3. จัดการประชุมเชิงปฏิบัติ Antioxidant กลุ่มวิจัยนาร่องสมุนไพรและยา วันที่ 17-21 ตุลาคม

2550 ณ ห้องประชุมและห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ใน

เครือข่ายนักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีเกษตร ภาควิชาตะวันออกเฉียงเหนือ

4. ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

บทความวิจัย เรื่อง Antioxidant activities of Thai purslane (*Portulaca oleracea*) leaf, stem and flower fractions extract *in vitro*

กำลังจัดทำเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Food Chemistry (Impact factor = 2.6)

ข้อบทความวิจัยที่คาดว่าจะตีพิมพ์ Omega-3 fatty acid content, antioxidant and

antiglycation activities of Thai purslane

กำลังจัดทำเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition (Impact factor

1.105)

**Antioxidant and antiglycation activities of Thai purslane (*Portulaca oleracea*)
leaf, stem and flower fractions extract *in vitro***

Sirithon Siriamornpun and Maitree Suttajit

Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology,

Maharakham University, 44000, Thailand.

Faculty of Science, Naresuan University Prayao Campus, Prayao, 56000 Thailand

Abstract

Purslane (*Portulaca oleracea*) has long been regarded as a food and medicinal plant. We investigated the antioxidant activity and total phenolic content of Thai purslane. The water extract of leaf, stem and flower fractions were measured by several *in vitro* systems of assays, namely DPPH radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, β -Carotene–linoleate bleaching assay, ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay, total antioxidant capacity and identification phenol compounds by high performance liquid chromatography with the UV-Diode Array detection. The extracts of different fractions were found to have different levels of antioxidant activity in the systems tested. The leaf extract showed the highest value of antioxidant activity based on DPPH radical scavenging activity, ferric reducing, while the green flower extract showed the highest value of antioxidant activity based on hydroxyl radical scavenging activity, β -carotene–linoleate bleaching assay and total antioxidant capacity. The predominant phenolic compounds were

gallic acid followed by caffeic acid and catechin. Our present study demonstrated that the water extract fractions of purslane have different responses in each antioxidant method.

Keywords: Purslane (*Portulaca oleracea*); DPPH assay; hydroxyl radical scavenging activity; β -Carotene–linoleate bleaching assay; FRAP assay; total antioxidant capacity ; total phenol content

1. Introduction

Research on relationship between the antioxidants and beneficial effect on prevention of non-communicable disease such as cardiovascular disease, cancer, diabetes etc, have been increasing sharply in recent years. Free radicals have been claimed to play a key role affecting human health as a cause of several severe diseases such as cancer, cardiovascular diseases and other diseases caused by cell degeneration. These free radicals can be generated during normal body function, and can be acquired from the environment. The oxygen radicals are associated with cellular and metabolic injury, and accelerating aging, cancer, cardiovascular diseases , neurodegenerative diseases, and inflammation (Ames, 1983; Stadtman, 1992; Sun, 1990; Dasgupta & De, 2006). The oxidative damage might be prevented or limited by dietary antioxidants (Dasgupta et al, 2006). The most extensively used synthetic antioxidant such as butylated hydroxyl anisole (BHA), and butylated hydroxyl toluene (BHT), have restricted use in food and been suspected of being responsible for liver damage and carcinogenesis (Ito, Fukushima,& Tsuda, 1986; Suja, Jayalekshmy & Arumughan, 2003; Grice, 1986; Wichi, 1988; Hettiarachchy, Glenn, Gnanasambandam, & Jonhnson, 1996 ; Senevirathne, Kim, Siriwardhana, Ha, Lee, &

Jeon, 2006). Epidemiological and *in vitro* studies strongly recommended that food containing phytochemical with antioxidant have potentially protective effects against many diseases including cancer, diabetes and cardiovascular diseases, (Senevirathne et al., 2006). Consumption of flowers and vegetables has been contributed to the prevention of degenerative processes caused by oxidative stress (Kaur & Kapoor, 2001; Vinson, Xuehui, Ligia, & Bose, 2001). Food such as flowers, vegetables and grains are reported to contain a wide variety of antioxidant components, including phytochemicals. Phytochemicals such as phenolic compounds, are considered beneficial for human health, decreasing the risk of degenerative diseases by reduction of oxidative stress and inhibition of macromolecular (Perira et al., 2007; Silva et al., 2004; Pulido et al., 2000). These compounds are found to be well correlated with antioxidant potential (Katalinic, Milos, Modun, Music, & Boban, 2004).

Purslane (*Portulaca oleracea*) has long been used for human food, animal feed and medicinal (Salisbury, 1961; Liu et al., 2000). There are many varieties of purslane and also called in different names since it grows in a wide of climate and regions. *P. oleracea*, hereafter referred as purslane, is widespread as a weed. It is fast growing, self-compatible and produces large numbers of seeds that have long viability. (Liu et al., 2000) etc., including Thailand. Recent research demonstrates that purslanes has better nutritional quality than the major cultivated vegetables. Specially, it has a high percentage of α -linolenic acid; an essential fatty acid (Liu et al., 2000). In addition, purslanes has been described as a “power food” because of its high nutritive and antioxidant properties (Simopoulos, Norman & Gillaspay, 2000). To our knowledge, there has been little published data on antioxidant activities and phenolic compounds of Thai purslane especially that of different morphological parts, namely leaf, stem and flower. Therefore, the purpose of this present study was to investigate

phenolic compounds were determined by reversed-phase HPLC/DAD and to evaluate antioxidation activity by using different *in vitro* methods. Different fractions of Thai purslane (*Portulaca oleracea*) namely leaf, stem and flower fractions were determined in an attempt to make a systematic comparison among their antioxidant activities and identify the fractions with high antioxidant activity for further studies.

2. Materials and methods

2.1 Sample

Purslane (*Portulaca oleracea*) leaf, stem and flower were collected from Mahasarakham, Thailand. The extracts prepared from the freeze dried leaf, stem and flower were made by boiling in distilled water for 5 min. The ratio between sample to extraction medium was 1:25. The mixtures were filtered through a filter paper (Whatman No. 1) (Dasgupta et al, 2004) and used for analyzing antioxidant activity *in vitro*. All analyses were performed in three replicates.

2.2. Reagents and standards

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2-Deoxyribose, trichloroacetic acid, tiobarbituric acid, β -Carotene, Tween 20, linoleic acid, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Folin-Ciocalteu reagent, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), ammonium molybdate, Phenolic acids (*p*-coumaric, tannic, benzoic, ferulic, gallic acid, caffeic, (+)-catechin) were obtained from Fluka (Neu-Ulm, Germany). HPLC-grade methanol, acetonitrile and other solvents and reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl radical scavenging activity

The hydrogen atom or electron donation ability of the corresponding extracts and some pure compounds was measured from the bleaching of purple colored methanol solution of DPPH (Gulluce, Sahin, Sokmen, Ozer, Daferera, Sokmen , Polissiou, Adiguzel & Ozkan, 2006) . The antioxidant activity of the extracts, on the basis of the scavenging activity of the stable 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) free radical, was determined by the method described by Braca et al. (2001). Aqueous extract (0.1 ml) was added to 3 ml of a 0.004% MeOH solution of DPPH. Absorbance at 517 nm was determined after 30 min, and the percent inhibition activity was calculated as $[(A_o - A_e)/A_o] \times 100$ (A_o = Absorbance without extract; A_e = absorbance with extract).

2.3 Hydroxyl radical scavenging activity

2- Deoxyribose oxidation method. 2- deoxyribose is oxidized by the Fenton reaction and degraded to malondialdehyde (Chung, Osawa, & Kawakishi, 1997). 0.2 ml solution of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (10mmol) and EDTA (10mmol) was prepared in screw-capped test tube, and 0.2 ml of α -2-deoxyribose solution (10mmol), the sample solution and a phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 mol) was added to give a total volume of 1.8 ml. Finally, 200 μ l of an H_2O_2 soln. (10mmol) was added to this reaction mixture and the whole incubated at 37°C for 4 h. After this incubation, 1ml each of a trichloroacetic acid solution (2.8%) and tiobarbituric acid solution (1.0%) were added

to the reaction mixture, and the whole boiled for 10 min, cooled in ice, and its absorbance measured at 520 nm.

·OH- scavenging activity. The ·OH- scavenging activity was calculated as the inhibition rate of 2- deoxyribose

$$\cdot\text{OH- scavenging activity (\%)} = [(1 - (\text{Ab}_s - \text{Ab}_o) / (\text{Ab}_c - \text{Ab}_o))] \times 100$$

Ab_o : absorbance with no treatment at 520 nm

Ab_c : absorbance of treated control at 520 nm

Ab_s : absorbance of treated sample at 520 nm

2.4 *β*-Carotene–linoleate bleaching assay

The antioxidant activity of purslane fraction extract was assayed based on the β - carotene bleaching method followed that of Othman et al. (2007). BHT was used as the standard. β -carotene (0.2 mg in 1 ml chloroform), linoleic acid (0.02 ml) and Tween 20 (0.2 ml) were transferred into a round bottomed flask. The mixture was then added to 0.2 ml of purslane fraction extract or standard or ethanol (as control). Chloroform was removed at room temperature under vacuum at reduced pressure using a rotary evaporator. Following evaporation, 50 ml of distilled water was added to the mixture, then shaken vigorously to form an emulsion. Two millilitre aliquots of the emulsion were pipetted into test tubes and immediately placed in a water bath at 50°C. The absorbance was read at 20 min intervals for 2 h at 470 nm .The antioxidant activity of extracts was based upon two different parameters, namely antioxidant activity (AA) and the oxidation rate ratio (ROR).

Antioxidant activity (A_A) was expressed as percent of inhibition relative to the control, using the following formula: (Suja et al., 2005)

$$A_A = [(R_{\text{control}} - R_{\text{sample or standard}}) / R_{\text{control}}] \times 100$$

where R_{control} and R_{sample} represent the bleaching rates of β -carotene without and with the addition of antioxidant, respectively. Degradation rates (R_D) were calculated according to first-order kinetics:

$$R_D = \ln (A_t/A_x) \times 1/t;$$

where $\ln$ is natural log, A_t is the initial absorbance at 470 nm at $t = 0$ and A_x is the absorbance at 470 nm at $t = 20, 40, 60, 80, 100, 120$ min.

The oxidation rate ratio (R_{OR}) was calculated by

$$R_{\text{OR}} = R_{\text{sample}}/R_{\text{control}};$$

where R_{sample} and R_{control} are as described earlier.

2.5 Ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay was determined based on the reduction of Fe^{3+} -TPTZ to a blue coloured Fe^{2+} TPTZ (Benzie & Strain, 1996). The FRAP assay was adapted from

Moyer et al., (2002). The antioxidant potential of the extract sample from citrus peel was determined against a standard curve of ferrous sulphate (Fe^{2+} , 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mM) in Milli-Q water or methanol with 0.1% (v/v) HCl.

The FRAP reagent was freshly prepared by mixing 100 ml acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 10 ml TPTZ solution (10 mM TPTZ in 40mM/HCl), 10 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (20mM) in a ratio of 10:1:1 and 12 ml distilled water, at to 37 °C. To perform the assay, 1.8 ml FRAP reagent, 180µl Milli- Q water and 60 µl sample, standard or blank was then added to the same test tubes, and incubated at 37 °C for 4 min absorbance was measured at 593 nm, using FRAP working solution as blank. The reading of relative absorbance should within the range 0–2.0; otherwise, the sample should be diluted. In the FRAP assay, the antioxidant potential of sample was determined from a standard curve plotted using $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ linear regression equation to calculate the FRAP values of the sample.

2.5 Determination of total antioxidant capacity

The assay is based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the extract and subsequent formation of a green phosphate/Mo(V) complex at acid pH (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999). Determined by the method described by Dasgupta et al., (2004). Aqueous extract (0.3 ml) was added to 3 ml of reagent solution (0.6M sulfuric acid, 28mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were incubated at 95 ° C for 90 min. After the mixture had cooled to room temperature, the absorbance of the solution was measured at 695 nm against a blank. The antioxidant activity is expressed as the number of equivalents of ascorbic acid and BHT.

2.4. Identification and quantification of phenolic compounds

2.4.1. Phenolics extraction

The phenolic compounds in investigated samples were extracted using a modification of the procedure described by Verica et al. (2005). Each sample (5 g) were mixed with 50 mL methanol/HCl (100:1, v/v) which contained 2% tert-butylhydroquinon, in inert atmosphere (N₂) during 12 h at 35°C in dark. The extract was then centrifuged at 4000 rpm/min, and supernatant was evaporated to dryness under reduced pressure (35–40 °C). The residue was redissolved in 25 mL of water/ethanol (80:20, v/v) and extracted four times with 25 mL of ethyl acetate. The organic fractions were combined, dried for 30–40 min with anhydrous sodium sulfate, filtered through the Whatman-40 filter, and evaporated to dryness under vacuum (35–40 °C). The residue was redissolved in 5 mL of methanol/water (50:50, v/v) and filtered through 0.45 µm filter before injected (20 µl) into the HPLC aperture. Samples were analyzed in triplicate.

2.4.2. Determination of total phenol content

The total phenolic contents of each extract were determined using the Folin–Ciocalteu reagent (Zhou & Yu, 2006). The reaction mixture contained 1 ml of purslane fractions extract, 0.5 ml of the Folin–Ciocalteu reagent, 3 ml of 20 % sodium carbonate and 10 ml of distilled water. After 2 h of reaction at ambient temperature, the absorbance at 765 nm was measured and used to calculate the phenolic contents using gallic acid as a standard. The total phenolic contents were then expressed as gallic acid equivalent (GAE), in mg/g dry sample.

2.4.3. HPLC-DAD system for analysis of phenolic compounds

HPLC analysis was performed using Shimadzu LC-20AC pumps, SPD-M20A Diode array detector and Chromatographic separation were performed on a LUNA C-18 column (4.6 x 250 mm i.d., 5 μ m). The composition of solvents and used gradient elution conditions were described previously by Verica et al. (2005) with some modification. The solvent system used was a gradient of mobile phase A contained 3% acetic acid in water; solution B contained mixture of 3% acetic acid, 25% acetonitrile and 72% water. The following gradient was used: 0–40 min, from 100% A to 30% A, 70% B with flow rate 1 mL/min; 40–45 min, from 30% A, 70% B to 20% A, 80% B with flow rate 1 mL/min; 45–55 min, from 20% A, 80% B to 15% A, 85% B with flow rate 1.2 mL/min; 55–57 min, from 15% A, 85% B to 10% A, 90% B with flow rate 1.2 mL/min; 57–75 min 10% A, 90% B with flow rate 1.2 mL/min. Operating conditions were as follows: column temperature, 40 °C, injection volume, 20 μ l, UV-Diode Array detection at 278 nm.

2.4 Statistical analyses

Analysis of variance (ANOVA) in a completely randomised design, Duncan's Multiple Range Test, Pearson's correlation coefficients were performed to compare the data. All determinations were done at least in triplicates and all were averaged. The confidence limits used in this study were based on 95 % ($P < 0.05$)

3. Results and discussion

Several methods have been used to determine antioxidant activity of plants. Our present study therefore decided to use six various established methods to evaluate antioxidative activity of purslane, namely, DPPH radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, β -carotene–linoleate bleaching assay, ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay, total antioxidant capacity, total phenol content and identification phenol compounds. The results obtained from each analysis were shown and discussed as follows:

3.1 *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity*

DPPH is a free radical compound and has been widely used to test the free radical-scavenging ability of various samples (Hatano, Takagi, Ito, & Yoshida, 1997; Shimoji et al., 2002; Sakanaka, Tachibana & Okada, 2005). It has a stable free radical with a characteristic absorption at 517 nm, was used to study the radical scavenging effects of extracts. As antioxidants donate protons to this radical, the absorption decreases. To evaluate the scavenging effects of DPPH of water extract of leaf, stem and flowers, DPPH inhibition was investigated. These results are shown as relative activities against BHT and ascorbic acid (Fig.2a). The activity of 200 ppm ascorbic acid was high, followed by BHT, flower, stem and leaf respectively.

Antioxidants, on interaction with DPPH, either transfer an electron or hydrogen atom to DPPH, thus neutralising its free radical character (Naik et al., 2003).The colour changes from purple to yellow and its absorbance at wavelength 517 decreases. Different parts of Thai purslane (*Portulaca oleracea*) extract quenched DPPH free

radical (Table 1) in a dose-dependent manner [$r^2 = 0.8612$] ($P < 0.05$) for leaf; [$r^2 = 0.91773$] ($P < 0.05$) for stem; [$r^2 = 0.76786$] ($P < 0.05$) for flower. DPPH assay shows that, in this system, the radical-scavenging activities of different parts of Thai purslane are in the order flower > stem > leaf. The relative activities of DPPH inhibition of different parts of purslane against the control (ascorbic acid and BHT) (data not shown). Similar results values were also found in IC_{50} values as shown in Table 1. IC_{50} values (concentration of sample required to scavenge 50% free radical or to prevent lipid peroxidation by 50%) were found the least in flower (0.006 ± 0.54), followed by stem (0.08 ± 0.39), and leaf (0.10 ± 0.76 mg/ml)

Table 1
DPPH radical scavenging activity of different part of Thai purslane (*Portulaca oleracea*)

sample	concentration (mg/ml)	% Inhibition $\pm$ SD	Regression equation(r) ^a	IC_{50} (mg/ml)
leaf	0.1	13.71 $\pm$ 0.19	$y = 14.715x + 10.412$ ($r^2 = 0.8612$)	0.10 $\pm$ 0.76 ^a
	0.2	48.59 $\pm$ 2.11		
	0.4	63.99 $\pm$ 1.07		
	0.8	69.78 $\pm$ 0.25		
	1.6	76.71 $\pm$ 0.42		
stem	0.1	28.53 $\pm$ 1.88	$y = 16.799x + 14.725$ ($r^2 = 0.9177$)	0.08 $\pm$ 0.39 ^b
	0.2	43.34 $\pm$ 7.75		
	0.4	75.42 $\pm$ 2.67		
	0.8	88.18 $\pm$ 0.14		
	1.6	90.11 $\pm$ 0.45		
flower	0.1	47.76 $\pm$ 0.22	$y = 9.9775x + 48.29$ ($r^2 = 0.7678$)	0.006 $\pm$ 0.54 ^c
	0.2	76.01 $\pm$ 0.19		
	0.4	86.95 $\pm$ 0.09		
	0.8	88.95 $\pm$ 0.11		
	1.6	91.01 $\pm$ 0.09		

3.2 Hydroxyl radical scavenging activity

Hydroxyl radical is the most reactive among reactive oxygen species (ROS) and it bears the shortest half-life compared with other ROS. Amongst the oxygen radical, hydroxyl radical is the most reactive and induces severe damage to the adjacent biomolecules (Sakanaka et al., 2005). The scavenging abilities of purslane fraction extracts on hydroxyl radical inhibition by the 2-deoxyribose oxidation method are shown in Table 2. The results were indicated as the inhibition rate. Different parts of Thai purslane extract showed good hydroxyl radical scavenging activities (8.54-23.93 %) at a concentration of 1.6 mg/ml in the reaction mixture. Each extract showed hydroxyl radical scavenging activity was increased with increasing concentration of the extract sample. Flower fraction had the higher activity than that of other fractions but lower than that of 200 ppm ascorbic acid and BHT (Table 2). Flower had the highest value of IC_{50} (0.23 ± 0.05), followed by leaf (IC_{50} 0.25 ± 0.08), and the lowest activity was found in stem (IC_{50} 0.28 ± 0.04 mg/ml).

Table 2
Hydroxyl radical scavenging activity of different part of Thai purslane (*Portulaca oleracea*)

sample	concentration (mg/ml)	% Inhibition $\pm$ SD	Regression equation (r) ^a	IC ₅₀ (mg/ml)
leaf	0.1	1.20 $\pm$ 0.81	$y = 3.6885x + 26.44$ ($r = 0.9548$)	0.25 $\pm$ 0.54 ^b
	0.2	4.16 $\pm$ 0.36		
	0.4	6.50 $\pm$ 0.34		
	0.8	11.95 $\pm$ 1.13		
	1.6	14.91 $\pm$ 0.76		
stem	0.1	0.51 $\pm$ 0.50	$y = 4.6767x + 16.976$ ($r = 0.9633$)	0.28 $\pm$ 0.24 ^a
	0.2	2.12 $\pm$ 0.89		
	0.4	3.71 $\pm$ 0.49		
	0.8	6.56 $\pm$ 0.11		
	1.6	8.54 $\pm$ 2.8		
flower	0.1	-19.02 $\pm$ 0.59	$y = 6.0792x + 14.135$ ($r = 0.9657$)	0.23 $\pm$ 0.59 ^c
	0.2	0.51 $\pm$ 0.12		
	0.4	5.77 $\pm$ 0.83		
	0.8	12.85 $\pm$ 0.90		
	1.6	23.93 $\pm$ 1.71		

3.3 β -Carotene–linoleate bleaching assay

In the β -carotene bleaching assay, linoleic acid produces hydroperoxides as free radicals during incubation at 50 °C. The presence of antioxidants in the extract will minimize the oxidation of β -carotene by hydroperoxides. Hydroperoxides formed in this system will be neutralized by the antioxidants from the extracts. In this study, we evaluated the antioxidant activity of different parts of Thai purslane extracts by β -carotene–linoleate bleaching method because β -carotene shows strong biological activity and is physiologically important compound (Sarkar, Bishayee, & Chatterjee, 1995; Kumazawa, Taniguchi, Suzuki, Shimura, Kwon, & Nakayama 2002; Sakanaka et al. 2005). Thus, the degradation rate of β -carotene–linoleate depends on the antioxidant activity of the extracts. There was a correlation between degradation rate

and the bleaching of β -carotene; where the extract with the lowest β -carotene degradation rate exhibited the highest antioxidant activity. All extracts has a lower antioxidant activity than BHT (Figs.3). The antioxidant activity of purslane extracts followed the parts of Stem (22.67 ± 0.64) > leaf (37.99 ± 0.27) > flower (38.13 ± 1.19) are shown in Table 3. There was a significant difference ($P < 0.05$) between the antioxidant activity of difference parts.

Linoleic acid hydroperoxides attack the β -carotene molecule and, as a result, it undergoes rapid decolorization. The corresponding decrease in absorbance can be monitored spectrophotometrically. The presence of antioxidant extracts can hinder the extent of β -carotene bleaching by acting on the free radicals formed in the system (Jayaprakasha, Singh, & Sakariah, 2001; Suja et al., 2005). Oxidation rate ratio bears an inverse relationship with antioxidant activity index. The addition of an antioxidant-containing sample, individual antioxidants (Von, Joubert, & Hansmann, 1997), or plant extracts (Moure, Franco, Sineiro, Domínguez, Núñez, & Lema, 2000; Koleva, Beek, Linssen, Groot, & Evatatieva, 2001), results in retarding β -carotene bleaching.

Table 3

Antioxidant activity of different part of Thai purslane by β -Carotene–linoleate bleaching method

Purslane fraction extract	A_A^a	R_{OR}^b
leaf	37.99 ± 0.27	0.62 ± 0.003
stem	22.67 ± 0.64	0.77 ± 0.006
flower	38.13 ± 1.19	0.619 ± 0.012
BHT	14.58 ± 0.28	0.854 ± 0.003

Concentration sample was 1.6 mg/ml. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Means with different letters were significantly different at the level $P < 0.05$.

^aAntioxidant activity index.

^bOxidation rate ratio.

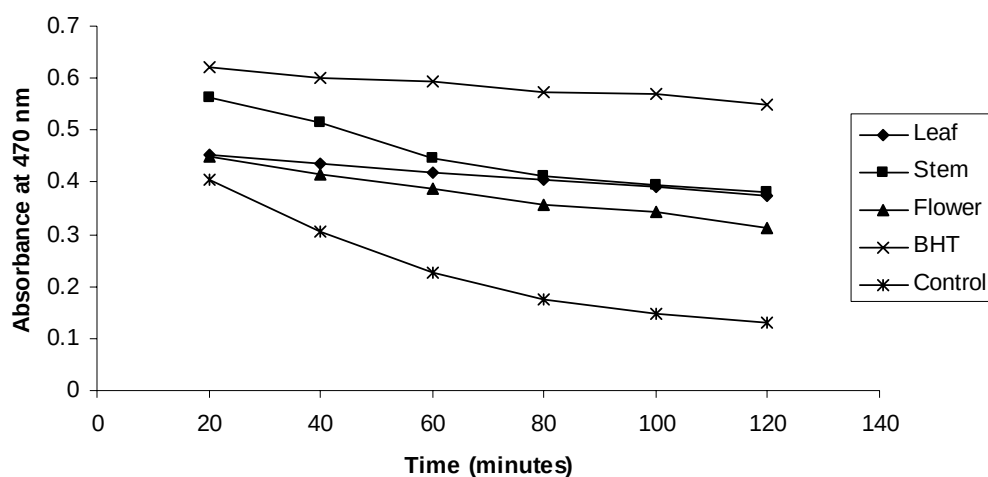


Fig.1 Degradation rate of different part of Thai purslane by β -Carotene–linoleate bleaching method ($n = 3$). Concentration sample was 0.04 g/ml (40000 ppm). BHT at 200 ppm was used as the standard.

3.4 Ferric reducing activity based on FRAP assay

FRAP assay measures the reducing potential of an antioxidant reacting with a ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} –TPTZ) complex and producing a coloured ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} –TPTZ) (Benzie & Strain, 1996). Generally, the reducing properties are associated with the presence of compounds, which exert their action by breaking the free radical chain through donating a hydrogen atom (Gordon, 1990; Duh, Du, & Yen, 1999). According to Benzie and Strain (1996), the reduction of Fe^{3+} –TPTZ complex to blue coloured of Fe^{2+} –TPTZ occurs at low pH. FRAP values of the extracts of purslane fractions are shown in Fig. 4. Leaf had the highest FRAP value of 0.497 ± 0.004 followed by flower (0.278 ± 0.009) and stem (0.129 ± 0.002 $\mu\text{mol FeSO}_4/100\text{g dry sample}$). This result indicated that leaf fraction had significantly stronger ($P < 0.05$) reducing power than other fractions.

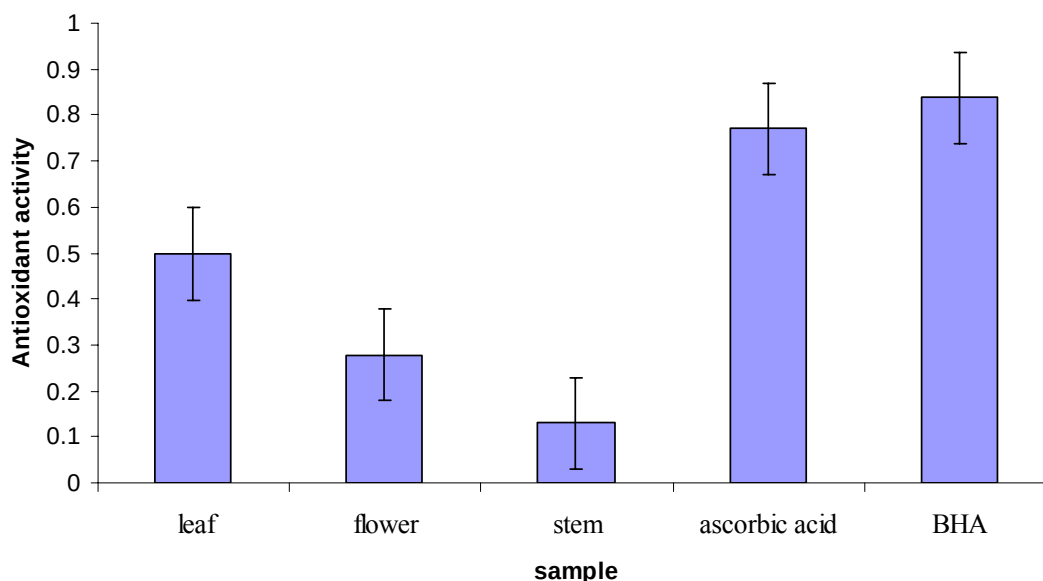


Fig. 2. Antioxidant potential of different part of Thai purslane extracts assayed by FRAP assay. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Means with different letters were significantly different at the level of $P < 0.05$.

3.5 Determination of total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity of different part of purslane is expressed as number of equivalents of ascorbic acid and BHT (Table 4). The assay is based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the extract and subsequent formation of a green phosphate/Mo(V) complex at acid pH. The phosphomolybdenum method is quantitative since the antioxidant activity is expressed as the number of equivalents of ascorbic acid (Prieto, Pineda, & Aguilar., 1999). Flower had a higher capacity than the other parts. The results from various free radical-scavenging system revealed that the part of purslane had significant antioxidant activity. The extracts were found to have different levels of antioxidant activity in the systems tested. The antioxidant activities of the part were flower > stem > leaf.

Table 4
Total antioxidant capacity of different part of Thai purslane

Sample	Equivalent to ascorbic acid (mg)/mg part of purslane	Equivalent to BHA (mg)/mg part of purslane
leaf	0.458 ^c	0.157 ^b
stem	0.555 ^b	0.129 ^c
flower	0.909 ^a	0.285 ^a

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Means with different letters were significantly different at the level $P < 0.05$.

3.6 Phenolic compounds analysis

3.6.1. Determination of total phenol content

Phenolic or polyphenol have received considerable attention because of their physiological function, including antioxidant, antimutagenic and antitumour activities (Othman et al., 2007).

Plant phenolics present in flower and vegetables have received considerable attention because of their potential antioxidant activity (Lopez-Velez, Martinez_Martinez, & Del Valle-Ribes, 2003). Phenolic compounds are widely distributed in plants (Li, Smith, & Hossain, 2006), have gained much attention, due to their antioxidant activities and free radical scavenging abilities, which potentially have beneficial implication in human health (Imeh & Khokhar, 2002; Ross & Kasum, 2002; Li, Smith, & Hossain, 2006). Total phenol content (TPC) was determined in comparison with standard gallic acid and the results expressed in terms of mg AGE/g dry sample. The TPC values for purslane fractions extract were flower (24.12 ± 0.15) stem (8.60 ± 0.91) and leaf (5.69 ± 0.86 mg AGE/g dry sample) respectively (Table 5).

Table 5
Total phenolic compounds of Thai purslane

Sample	Total phenolic compounds
leaf	5.69 $\pm$ 0.86 ^c
stem	8.60 $\pm$ 0.91 ^b
flower	24.12 $\pm$ 0.15 ^a

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Means with different letters were significantly different at the level $P < 0.05$.

3.6.2. HPLC-DAD system for analysis of phenolic compounds

The HPLC-DAD analysis of purslane fractions aqueous extracts revealed the presence of phenolic compounds. By this means, in the four analysed fractions, it was possible to identify seven phenolic compound : *p*-coumaric acid, tannic acid, benzoic acid , ferulic acid, gallic acid, caffeic acid, (+)-catechin (Table. 6). Gallic acid was the predominant phenolic compounds in the all parts purslane contributing about xxx mg/L in flower to xxx mg/L in leaf .. Catechin showed the highest content in flower(xxx $\pm$ xxx mg/L) and tannic aric acid showed the highest content in stem (xx $\pm$ xx mg/L) .While other phenolic compounds were not present compared with the available standard in this present study.

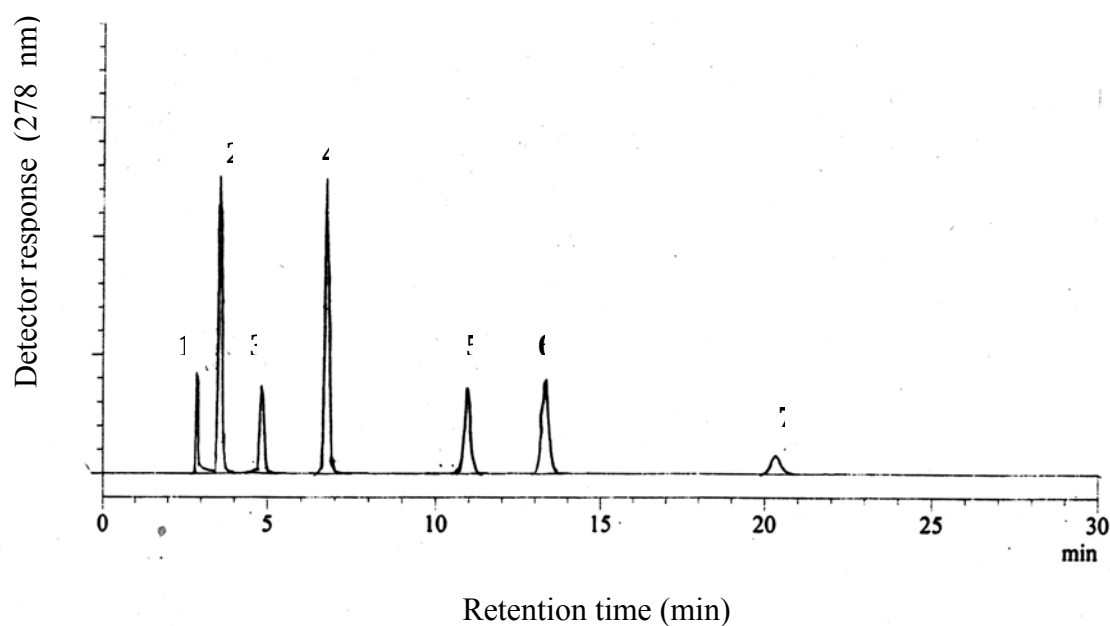


Fig. HPLC-DAD of standard phenolic compounds. 1.Gallic acid 2.tannic acid
3.(+)-catachin 4. Caffeic acid 5. *p*-Coumaric acid 6.Ferulic acid 7. Benzoic acid

Table 6
Phenolic compound content (mg/L) of Thai purslane.

Compounds	Thai purslane		
	leaf	stem	flower
gallic acid	21.01 ± 0.42	6.89 ± 0.89	10.97 ± 0.97
tannic acid	0.51 ± 0.77	0.29 ± 0.20	0.29 ± 0.81
(+)-catechin	2.54 ± 0.90	0.84 ± 0.35	5.23 ± 0.52
caffeic acid	ND	ND	ND
<i>p</i> -coumaric	ND	ND	ND
ferulic acid	ND	ND	ND
benzoic acid.	ND	ND	ND

Values are means ± SD ($n=3$), and they are given as mg/L of investigated bitter gourd fractions.

ND: not detected

Our present study demonstrated that the antioxidant activity could be determined by using several test systems. However, there are several methodology limitations for antioxidant determination (Kaur & Kapoor, 2001).

In conclusions, the present study has demonstrated that purslane fractions were rich in phenolics and has a strong antioxidant activity and a radical scavenging action in all of the tested methods. This fact suggests that purslane is a good source of natural antioxidant. These results showed that Thai purslane may have health benefits for consumers as a potential functional food or value-added ingredient.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge to Thai Research Fund for the research grant. We also thank Mahasarakham University and Rajanangala University of Technology Isan Klasin campus, Thailand for the laboratory and facilities supports to this work. The authors are also grateful to Prof. Duo Li for his critical reading of the manuscript and Miss Jittawan Kubola for her technician assistance..

References

- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221, 1256-1264.
- Benzie I. F. F, & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70–76.
- Benzie, I. F., & Stezo, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural*

and *Food Chemistry*, 47, 633–636.

- Braca, A., Tommasi, Nunziatina, D., Bari, Lorenzo, Di, Pizza, Cosimo, Politi, Mateo, & Morelli, Ivano. (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural Products*, 64, 892–895.
- Chung, S., Osawa, T., & Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Bsci. Biotech Bioche*, 61(1), 118-123.
- Dasgupta, N., & De, B. (2004). Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. *Food Chemistry*. 88, 219-224.
- Dasgupta, N., & De, B. (2006). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, 101, 471-474.
- Duh, P. D., Du, P. C., & Yen, G. C. (1999). Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1055–1061.
- Dziedzic, S. Z., & Hudson, G. J. F. (1983). Polyhydrochalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*, 12, 205-212.
- El Batran, S. A. E. S., El-Gengaihi, S. E., & El Shabrawya, O. A. (2006). Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 108, 236–242.
- Govindarajan, R., Singh, D.P., & Rawat, A.K.S. (2007). High-performance liquid chromatographic method for the quantification of phenolics in ‘Chyavanprash’ a potent Ayurvedic drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 527–532.

- Grice, H.C. (1986). Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the live, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1127-1130.
- Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., et al (2006). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*. In press.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common flowers as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719-1726.
- Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in-vitro. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* (pp. 1–18). London: Elsevier Applied Science.
- Hatano, T., Takagi, M., Ito, H., & Yoshida, T. (1997). Phenolic constituents of liquorice. VII. A new calcone with a potent radical scavenging activity and accompanying phenols. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45, 1485–1492.
- Hettiarachchy, N.S., Glenn, K.C., Gnanasambandam, R., & Jonhnson, M.G., (1996). Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trionella foenumgraecum*) for ground beef patties. *Journal food science*, 61, 516-519.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73(3), 285–290.
- Ito, N., Fukushima, S., & Tsuda (1986). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 5, 109–150.

- Imeh, U., & S. Khokhar. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in flowers: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6301.
- Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I., & Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) catechin. *Food Chemistry*, 86, 593–600.
- Kaur, C., & Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in flowers and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- Kirtikar, K.R., & Basu, B.D., (1993). In: Blatter, E., Caius, J.F., Mhaskar, K.S. (Eds.), *Indian Medicinal Plants*, vol. 2. Lalit Mohan Basu, Allahabad, India.
- Koleva, II., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., & Evstatieva, L.N. (2001). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal*, 13, 8–17.
- Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., & Nakayama, T. (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 373–377.
- Kusamran, W.R., Tepsuwan, A., & Kupradinun, P. (1998). Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai vegetables. *Mutation Research*, 402, 247–258.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27 (4), 969-978.
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzminski, R., Lojek, A., Katrich, E., et al. (2003). Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma

- lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5780–5.
- Li , B.B., Smith , B., & Hossain ,Md. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48, 182–188.
- Lopez-Velez, M., Martinez_Martinez, F., & Del Valle-Ribes, C. (2003). The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 43, 233–244.
- Liu, L, Howe, P., Zhou, Y., Xu, Z., Hocart, C. and Zhang, R. (2000). Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *Journal of Chromotography A*, 893, 207-213.
- Moure. A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J, & Lema, J.M. (2000). Evaluation of extracts from Gevuina avellana hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3890–7.
- Moyer, R.A., Hummer K.E., Finn, C.E., Frei, B., & Wrolstad,R.E., (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small flowers: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519.
- Naik, G. H., Priyadarsini, K. I., Satav, J. G., Banavalikar, M. M., Sohoni, P. P., Biyani, M. K., & Mohan, H. (2003). Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry*, 63, 97–104.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* ,100 ,1523–1530.

- Pereira, J.A. , Oliveira, I., Sousa, A., Valenta~o, P., Andrade, B.P., Ferreira C.F.R.I., et al. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 45 , 2287–2295.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.
- Pulido, R., Bravo, L.,& Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396–3402.
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (*kakinoha-cha*). *Food Chemistry* ,89 , 569–575.
- Sarkar, A., Bishayee, A., & Chatterjee, M. (1995). Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepato carcinogenesis. *Cancer Biochemistry Biophysics*, 15, 111–125.
- Senevirathne, M., Kim, S., Siriwardhana, N., Ha, J., Lee, K., & Jeon, Y. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Science Technology International*, 12(1), 27-38.

- Shimoji, Y., Tamura, Y., Nakamura, Y., Nanda, K., Nishidai, S., Nishikawa, Y., Ishihara, N., Uenakai, K., & Ohigashi, H. (2002). Isolation and identification of DPPH radical scavenging compounds in kurosu (Japanese unpolished rice vinegar). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6501–6503.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentaño, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., & Ferreira, M.A.(2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) flower (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4705–4712.
- Simopoulos, A.P., Norman, H.A. & Gillspy 1995), in A.P. Simopoulos (Ed.), Plants in Human Nutrition, *World Review of Nutrition and Diet*. Karger, Basel, 77, 47.
- Singh, A., Singh, P. S., & Bamezai, R. (1998). *Momordica charantia* L. (Purslane) peel, pulp, seed and whole flower extract inhibits mouse skin papillomagenesis. *Toxicology Letters*, 94, 37-46.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257, 1220-1224.
- Suja, K. P., Jayalekshmy, A., & Arumughan, C. (2003). Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, 91, 213-219.
- Sun, T., & Ho, C. T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90, 743–749.
- Sun, Y. (1990). Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free radical Biology and Medicine*, 8, 583-599.
- Uzelac, D. V., Pospisil, J., Levaj, B, Delonga, K. (2005). The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity, *Food Chemistry*, 91 , 373–383.

- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Flowers, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Vinson, J. A., Xuehui, S., Ligia, Z., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5315-5321.
- Virdi, J., Sivakami, S., Shahani S., Suthar, A. C., Banavalikar, M. M., & Biyani, M. K. (2003). Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 107-111.
- Von, G. A., Joubert, E., & Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 632-8.
- Wichi, H. P. (1988). Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, 26, 717-723.
- Wu, S. J., & Ng, L.T. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT-Food Science and Technology*, in press
- Yasui, Y., Hosokawa, M., Sahara, T., Suzuki, R., Ohgiya, S., Kohno, H., Tanaka, T., & Miyashita, K. (2005). Purslane seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR γ in human colon cancer Caco-2 cells. Prostaglandins, *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73, 113-119.

- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1619–1624.
- Zhou, K., & Yu, L. (2006). Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 39, 1155–1162.