ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DMPD กับปริมาณฟีนอลิก วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน

Correlation between Antioxidant Capacities of Fruits Analyzed with DMPD and Phenolic Contents, Vitamin C, Vitamin E and Beta-Carotene

วรานนท์ ทองอินลา ชลธิชา วรรณวิมลรักษ์ และภารดี ช่วยบำรุง*

Varanont Thonginla, Chonthicha Wanwimolruk and Paradee Chuaybamroong*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Department of Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Thammasat University

บทคัดย่อ

การศึกษานี้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ 12 ชนิด ด้วยวิธี N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) ซึ่งใช้หลักการทำลายสีของอนุมูลอิสระโดยไฮโดรเจนอะตอมที่มาจากสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและวิตามินซีเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ รวมถึงมีการใช้ข้อมูลปริมาณวิตามินอีและเบต้าแคโรทีนจากกรมอนามัยในการศึกษาความสัมพันธ์ด้วย ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากวิธี DMPD มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับปริมาณฟีนอลิกและวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญ ($r = 0.868 - 0.882$, p-value = 0.000) แต่มีความสัมพันธ์กับวิตามินอีและเบต้าแคโรทีนอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($r = 0.165$, p-value = 0.608 และ $r = -0.337$, p-value = 0.284 ตามลำดับ) แสดงว่าวิธีนี้ใช้ได้กับสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มที่รับ-ให้อิเล็กตรอนเท่านั้น

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลิกในผลไม้ วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน

Abstract

This study analyzed antioxidant capacities of 12 fruits using N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) assay. The assay is based on decolorization of free radicals by hydrogen atoms donated from the antioxidant. Phonolic contents and vitamin C were analyzed to explore the correlations with the antioxidant capacities. Vitamin E and beta-carotene (data obtained from Department of Heath) were also included for the correlations. It was found that significant correlations were from phenolic contents and vitamin C ($r = 0.868 - 0.882$, p-value = 0.000), but not from vitamin E and beta-carotene ($r = 0.165$, p-value = 0.608 and $r = -0.337$, p-value = 0.284, respectively). It is implied that the decolorimetric assay is suitable only with the electron-reducing antioxidants.

Keywords: Antioxidant capacity; Phenolic in fruit; Vitamin C; Vitamin E; Beta-carotene

*Corresponding author. E-mail : paradee@tu.ac.th

บทนำ

อนุมูลอิสระหมายถึงอะตอมหรือโมเลกุลใดๆก็ตามที่มีจำนวนอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นไม่อยู่ในสภาวะที่เสถียร จำเป็นต้องดึงอิเล็กตรอนมาจากโมเลกุลอื่นหรือถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ขาดคู่ออกไปเพื่อทำให้ตัวเองเสถียร แต่จะไปทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลอื่นขาดคู่หรือมีอิเล็กตรอนเกินมาเช่นเดียวกัน การเกิดอนุมูลอิสระจึงเกิดต่อเนื่องไปเรื่อยๆเสมือนเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Wikipedia, 2013)

อนุมูลอิสระกลุ่มที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเป็นอย่างมากคือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น ไฮดรอกซิล ($^{\circ}OH$) เปอรอกซิล (ROO°) อัลคอกซิล (RO°) ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($^{\circ}O_2^-$) สามารถทำอันตรายเซลล์เนื้อเยื่อปกติของสิ่งมีชีวิต เช่น ทำลายกรดนิวคลีอิกใน DNA ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็ง หรืออาจทำลายเยื่อหุ้มเซลล์จนทำให้เซลล์แตกและสารประกอบภายในเซลล์รั่วไหลออกมา หรือทำลายเอนไซม์ต่างๆจนการทำงานแปรปรวนเกิดเป็นอันตรายหรืออาการเจ็บป่วยขึ้นมา อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาระหว่างกระบวนการเผาผลาญภายในร่างกาย หรือเป็นไปได้ว่าร่างกายจงใจสร้างขึ้นมาเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ โดยสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ไอระเหยของสารอินทรีย์ สารฆ่าแมลง ไอเสียของรถยนต์ ก็ช่วยก่อให้เกิดอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน (Machlin & Bendich, 1987)

ผลกระทบของอนุมูลอิสระต่อปัญหาสุขภาพกำลังเป็นที่กังวลของประชาชนโดยทั่วไป นำมาสู่กระแสการรับประทานอาหารที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระกันมากขึ้น ซึ่งสารประกอบฟีนอลิก วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีนที่มีอยู่ในผักผลไม้ก็เป็นส่วนหนึ่งที่ร่างกายใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยการให้อิเล็กตรอนโดยที่ตัวมันเองไม่กลายเป็นอนุมูลอิสระไปด้วย (Wikipedia, 2014) โดยวิตามินซีสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระในกลุ่มของซุปเปอร์ออกไซด์ ไฮดรอกซิล และออกซิเจนอะตอมเดี่ยว ($^1O_2$) รวมถึงช่วยกระตุ้นการทำงานของวิตามินอี (Machlin & Bendich, 1987) วิตามินอีเป็นได้ทั้ง α-tocopherol และ β-tocopherol (Corral-Aguayo *et al*., 2008) ละลายในไขมันได้ดี สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระในกลุ่มของเปอรอกซิล ไฮดรอกซิล ซุปเปอร์ออกไซด์ และออกซิเจนอะตอมเดี่ยว โดยทั่วไปวิตามินอีจะอยู่ในเซลล์เมมเบรน ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระเปอรอกซิลในปฏิกิริยา lipid peroxidation (Machlin & Bendich, 1987) มีส่วนช่วยลดไขมันความหนาแน่นต่ำหรือ low density lipoprotein (LDL) ด้วยการไปรับอิเล็กตรอนอิสระจากกรดไขมัน ขณะที่เบต้าแคโรทีนสามารถเปลี่ยนออกซิเจนอะตอมเดี่ยวที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาให้ไปอยู่ในรูปของ triplet oxygen ($^3O_2$) ซึ่งไวต่อการเกิดปฏิกิริยาน้อยกว่า สามารถป้องกันมะเร็งจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตและช่วยขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน LDL ด้วยเช่นกัน รวมถึงช่วยเพิ่มไขมันความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein: HDL) อีกด้วย (Hercberg *et al*., 1998)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักผลไม้กระทำได้หลายวิธี แต่ที่นิยมในปัจจุบันคือวิธี decolorimetric assay ที่ใช้หลักการสร้างอนุมูลอิสระที่ให้สีขึ้นมา สารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนที่ครบคู่ ความเข้มของสีจึงลดลงและแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในผักผลไม้นั้น วิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปได้แก่ ABTS (2,2'-azinobiz-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ริเริ่มโดย Miller *et al.* ในปี 1993 วิธีนี้มีข้อเสียอยู่ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดนั้นมีหลายช่วง คือ 415, 645, 734 และ 815 นาโนเมตร รวมถึงจะต้องวัดจุดยุติของการทำลายสี (time of the measure) ภายในเวลา 4-6 นาที เท่านั้น ซึ่งภายในช่วงเวลาดังกล่าวยังสามารถเกิดความคลาดเคลื่อนของจุดยุติได้อีก (Prior *et al*., 2005) ต่อมาจึงมีการคิดค้นวิธี DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine) โดย Fogliano *et al*. ในปี 1999 ซึ่งจุดยุติของการทำลายสีมีความคงที่ (stable end point) มากกว่าวิธี ABTS โดยไม่จำเป็นต้องรีบวัดจุดยุติภายใน 4-6 นาที แต่ข้อเสียจะอยู่ที่ความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) และความสามารถในการให้ผลซ้ำๆ (reproducibility) จะลดลงเมื่อใช้กับสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มที่ไม่ชอบ

น้ำเช่น α-tocopherol หรือ BHT (Fogliano *et al,* 1999) นอกจากนี้ยังมีวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระของไนโตรเจนอินทรีย์ซึ่งมีลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจากอนุมูลอิสระเปอรอกซิล ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยาได้อย่างว่องไวกับอนุมูลอิสระเปอรอกซิลจึงอาจไม่ทำปฏิกิริยากับ DPPH หรืออาจทำปฏิกิริยาที่ช้ามาก รวมถึงอัตราของการเกิดปฏิกิริยาไม่ได้แปรผันเป็นเส้นตรงตามความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มี จึงทำให้การรายงานผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผิดพลาดไปจากความเป็นจริงได้ (Huang *et al*., 2005) ในการศึกษานี้จึงเลือกวิธี DMPD เป็นตัวแทนของวิธีในกลุ่มของ decolorimetric assay

อย่างไรก็ตาม วิธีในกลุ่มของ decolorimetric assay ไม่ได้ศึกษาถึงความสามารถในการทำลายโซ่พันธะในกระบวนการ lipid autoxidation ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ จึงเป็นเพียงเสมือนการไตเตรทของปฏิกิริยารีดอกซ์ในหลอดทดลองที่ศึกษาความสามารถในการลดอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่ (reducing capacity) เท่านั้น โดยไม่มีการแข่งขันการทำปฏิกิริยาดังที่ปรากฏในความเป็นจริงภายในร่างกาย รวมถึงไม่มีอนุมูลอิสระของออกซิเจนมาเกี่ยวข้องด้วย (Huang *et al*., 2005) ทำให้เกิดเป็นคำถามว่าวิธี decolorimetric assay เหมาะสมในการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากน้อยเพียงใดซึ่งเป็นที่มาของการศึกษานี้ โดยหากวิธี decolorimetric assay มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้แล้ว ความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากวิธี decolorimetric assay กับสารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ทุกชนิดทั้งจากสารประกอบฟีนอลิก วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน ควรจะต้องเกิดขึ้นอย่างชัดเจนและใกล้เคียงกัน โดยการศึกษานี้ใช้ DMPD ที่วัดความสามารถในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของไอออนบวกเอมีน (amine cation) อันเปรียบเทียบได้กับการวัดความสามารถในการทำปฏิกิริยารีดักชันของอนุมูลอิสระอัลคอกซิลและเปอรอกซิล (Asghar *et al*., 2007) ศึกษากับผลไม้ที่หาได้ง่ายในประเทศไทย 12 ชนิด โดยข้อมูลของปริมาณเบต้าแคโรทีนและวิตามินอีนำมาจากรายงานของสำนักโภชนาการ กรมอนามัย (2549) ผลการศึกษาที่ได้น่าจะช่วยสร้างความกระจ่างในเรื่องความครอบคลุมและข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผักผลไม้ด้วยวิธี decolorimetric assay ได้มากยิ่งขึ้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเตรียมอนุมูลอิสระ

การเตรียมอนุมูลอิสระกระทำตามวิธีของ Fogliano *et al*.(1999) โดยใช้สารละลาย DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ นำมา 1 มิลลิลิตร เติมลงในอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่มี pH 5.25 จากนั้นเติมเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เพื่อก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ $DMPD^{\circ+}$ ที่มีสีชมพูม่วง นำ $DMPD^{\circ+}$ 1 มิลลิลิตรไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์เป็นสารอ้างอิง ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กำหนดให้เป็นค่า A_0

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย Trolox

การศึกษากระทำตามวิธีของ Fogliano *et al*. (1999) โดยละลาย Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 100 มิลลิกรัมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.03 ถึง 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลาย Trolox แต่ละความเข้มข้นมา 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายอนุมูลอิสระ $DMPD^{\circ+}$ อยู่ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 505 นาโนเมตร โดยใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์เป็นสารอ้างอิง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กำหนดเป็นค่า A_f จากนั้นคำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ Trolox ในรูปของร้อยละ หรือ % inhibition จาก

$$\% \, inhibition = (1 - \frac{A_f}{A_0}) \times 100$$

ค่าที่ได้นำมาสร้างกราฟระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของ Trolox เพื่อหาค่า $IC_{50\%}$ หรือความเข้มข้นของ Trolox ที่ใช้ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50%

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้

การศึกษานี้ใช้ผลไม้ทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ มะม่วงเขียวเสวยสุก มะม่วงน้ำดอกไม้สุก ขนุนหนัง ฝรั่งกลมสาลี่ ฝรั่งไร้เมล็ด มะละกอฮอลแลนด์ กล้วยไข่ แก้วมังกร (เนื้อขาว) มะขามเทศ มะเขือเทศราชินี สับปะรดภูเก็ต และแอปเปิลแดง ที่ซื้อจากตลาดโดยทั่วไป นำมาสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Scalfi *et al*. (2000) หลังจากล้างทำความสะอาดและปอกเปลือกผลไม้แล้ว (ยกเว้นมะเขือเทศ ฝรั่ง และแอปเปิลที่ไม่ได้ปอกเปลือก) นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้เป็นเวลา 2 นาที โดยไม่มีการเติมตัวทำละลายหรือน้ำ จากนั้นชั่งตัวอย่างมา 100 กรัม นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) 4000 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำมากรองเพื่อแยกส่วนใสออกเก็บไว้ ส่วนที่เป็นตะกอนนำมาเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเหวี่ยงอีกครั้ง นำส่วนใสที่ได้ไปผสมกับส่วนใสในครั้งแรก ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ นำมาเติมเมทานอล 100 มิลลิลิตร และเหวี่ยงซ้ำที่ความเร็วรอบเดิมอีก 5 นาที

น้ำผลไม้ที่สกัดได้มีความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักเปียก/100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆกันด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วนำน้ำผลไม้แต่ละความเข้มข้นมา 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายอนุมูลอิสระ $DMPD^{\bullet+}$ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร บันทึกเป็นค่า A_f และคำนวณเป็น % inhibition จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของน้ำผลไม้ที่ใช้กับ % inhibition และหาความเข้มข้นของน้ำผลไม้ที่ก่อให้เกิดการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50% คำนวณเป็นค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ด้วยการนำค่า $IC_{50\%}$ ของ Trolox (mg Trolox/mL) หารด้วย $IC_{50\%}$ ของน้ำผลไม้ (g wet sample/mL) จะได้เป็น mg Trolox/g wet sample

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในผลไม้

การวิเคราะห์กระทำตามวิธีของ Waterhouse (2002) โดยนำน้ำผลไม้ที่สกัดได้ตามวิธีข้างต้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 70 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-ciocalteu's phenol reagent (1.24 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่าจำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 1-8 นาที (ในการศึกษานี้เขย่านาน 5 นาที) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (2.358 โมล/ลิตร) 15 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนถึงขีดปริมาตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค โดยนำกรดแกลลิคความเข้มข้น 50, 100, 250, 500 และ 750 มิลลิกรัม/ลิตร มาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆในลักษณะเดียวกับที่กล่าวไปแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร และสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในผลไม้จะรายงานเป็นค่าเทียบเท่ากับกรดแกลลิค หรือ Gallic acid equivalents (GAE) ในหน่วยมิลลิกรัม/ลิตร ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในผลไม้

การวิเคราะห์กระทำตามคู่มือปฏิบัติการของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2556) เริ่มจากนำผลไม้ 100 กรัม ปั่นรวมกับสารละลาย 3% Metaphosphoric acid–acetic acid 100 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ 1 นาที หยุดเครื่องแล้วเติม 3% Metaphosphoric acid–acetic acid อีก 50 มิลลิลิตร ปั่นต่ออีก 1 นาที นำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำน้ำผลไม้มา 1 มิลลิลิตรเติมลงในสารละลาย 2,6-dichlorophenolindophenol หรือ dye solution 9 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรทันที (ภายใน 13-17 วินาที) ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิค โดยนำกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่างๆกัน (5, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน dye solution 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรทันที ปริมาณวิตามินซีในผลไม้จะเทียบเท่ากับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคในหน่วยของไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ทั้ง 12 ชนิดในรูปของ $IC_{50\%}$ จาก 3 ซ้ำ (จัดซื้อในวัน-เวลาที่ต่างกัน) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยได้ดังภาพที่ 1 โดยนำเสนอ $IC_{50\%}$ เฉพาะส่วนที่ละลายน้ำ ซึ่งสับปะรดภูเก็ตและแอปเปิลแดงนั้นใช้ความเข้มข้นของผลไม้ที่สูงกว่าผลไม้ชนิดอื่น จึงแยกไปนำเสนอในรูป ข) เมื่อนำ $IC_{50\%}$ ของ Trolox มาเปรียบเทียบ สามารถนำเสนอผลในรูปของ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) สำหรับส่วนที่ละลายน้ำในภาพ ค) และส่วนที่ไม่ละลายน้ำในภาพ ง) โดยแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการศึกษา 3 ซ้ำไว้ด้วย โดยผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แม้ว่าลำดับของฝรั่งไร้เมล็ดในส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะต่างไปจากส่วนที่ละลายน้ำก็ตาม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ 12 ชนิดในส่วนที่ละลายน้ำ เรียงตามลำดับจากค่า TEAC (มิลลิกรัม Trolox/กรัมผลไม้) จากมากไปหาน้อย คือ มะขามเทศ (0.789) > ฝรั่งไร้เมล็ด (0.619) > ฝรั่งกลมสาลี่ (0.562) > มะละกอฮอลแลนด์ (0.187) > มะเขือเทศราชินี (0.184) > กล้วยไข่ (0.154) > แก้วมังกร (0.118) > มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (0.089) > มะม่วงเขียวเสวยสุก (0.06) > ขนุนหนัง (0.055) > สับปะรดภูเก็ต (0.013) > แอปเปิลแดง (0.003)

ทั้งนี้ วิธี DMPD ใช้การสร้างอนุมูลอิสระ $DMPD^{\circ+}$ (สีชมพูม่วง) ขึ้นมา (หรือ X° ในสมการที่ 1) สารต้านอนุมูลอิสระ (AH) ในผลไม้จะให้ไฮโดรเจนอะตอม (H) เพื่อไปรวมกับอิเล็กตรอนเดี่ยวใน $DMPD^{\circ+}$ ให้กลายเป็น $DMPD^{+}$ (ไม่มีสี) ดังสมการที่ 1 (Prior *et al*., 2005)

$$X^{\circ} + AH \longrightarrow XH + A^{\circ} \qquad \text{(สมการที่ 1)}$$

ดังนั้นผลไม้ยิ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระมากและให้ไฮโดรเจนอะตอมมาก ยิ่งทำลายสีที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้มากตามไปด้วย เทียบเท่าได้กับปฏิกิริยารีดักชันของอนุมูลอิสระอัลคอกซิลและเปอรอกซิล โดย Fogliano *et al.* (1999) ระบุว่าวิธีนี้เหมาะกับสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เท่านั้น ความไวในการเกิดปฏิกิริยา (sensitivity) จะลดลงอย่างมากหากสารต้านอนุมูลอิสระนั้นเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ เช่น α-tocopherol หรือ butylated hydroxytoluene (BHT) รวมถึงการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสาร DMPD จะมีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเช่นกัน ซึ่งในการศึกษานี้ชัดเจนว่าเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ค่า TEAC ของฝรั่งในภาพที่ 1 ค) นั้นสูงกว่าค่า TEAC เมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดมาก (ภาพที่ 1 ง) นอกจากนี้ กรดออร์แกนิคโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดซิตริกอาจรบกวนการทำปฏิกิริยาของ DMPD ได้ สารสกัดที่มีกรดออร์แกนิคสูงต้องระมัดระวังเรื่องความถูกต้อง (accuracy) ในการวิเคราะห์ด้วย (Sánchez-Moreno, 2002)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ละลายน้ำโดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent และรายงานผลเป็น Gallic acid equivalent (mg/L) (ภาพที่ 2 ก) พบว่าลำดับของผลไม้ที่มีปริมาณฟีนอลิกมากไปหาน้อยยังคงใกล้เคียงกับลำดับของ TEAC คือ มะขามเทศ (736) > ฝรั่งสาลี่ (355) > ฝรั่งไร้เมล็ด (318) > มะละกอฮอลแลนด์ (255) > มะเขือเทศราชินี (229) > สับปะรดภูเก็ต (207) > กล้วยไข่ (186) > มะม่วงเขียวเสวยสุก (169) > แอปเปิลแดง (153) > มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (111) > แก้วมังกร (76) > ขนุนหนัง (54) โดยสับปะรดภูเก็ตกับแอปเปิลแดงที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) เป็นสองอันดับสุดท้าย กลับมีปริมาณฟีนอลิกที่สูงกว่าผลไม้อื่นๆอีกหลายชนิด เป็นไปได้ว่าซัลเฟอร์และน้ำตาลในสับปะรดจะมีส่วนทำให้ค่าฟีนอลิกสูงเกินจริง เนื่องจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์และน้ำตาลจะแทรกแซงวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้Folin-Ciocalteu reagent (Waterhouse, 2002) ขณะที่ลำดับของฝรั่งนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Corral-Aguayo *et al.* (2008) ที่ศึกษาผลไม้ในประเทศเม็กซิโก 8 ชนิดและพบว่าฝรั่งเนื้อแดง (cv. Sardina) ให้ปริมาณฟีนอลิกสูงสุดคือ 231.7 มิลลิกรัม/100 กรัมผลไม้ (ใช้ 80% อะซิโตนในการสกัด) รวมถึงการศึกษาของ Lim *et al.* (2007) ที่พบว่าฝรั่งทั้งที่มีและไม่มีเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด 138-179 มิลลิกรัม/100 กรัม ขณะที่แก้วมังกรมีปริมาณฟินอลิกต่ำสุด (21 มิลลิกรัม/100 กรัม)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกด้วย Folin-Ciocalteu reagent ใช้หลักการแตกตัวฟีนอลิกเป็นโปรตอนและไอออนลบของ phenolate ซึ่งไอออนลบจะไปรีดิวซ์ Folin-Ciocalteu reagent ได้เป็นสารละลายสีน้ำเงิน การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกจึงเป็นการวัดความสามารถของการรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ TEAC การศึกษาส่วนใหญ่จึงพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟีนอลิก (Huang *et al*., 2005) ซึ่งในการศึกษานี้พบความสัมพันธ์เชิงเส้นอย่างมีนัยสำคัญ ($r = 0.868$, p-value = 0.000) ดังแสดงในภาพที่ 3 ก โดยค่า r หมายถึงการมีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรงซึ่งจะมีนัยสำคัญหรือไม่ ขึ้นอยู่กับค่า N หรือจำนวนตัวอย่าง (ในที่นี้ N = 12) โดยต้องพิจารณาจากค่า p-value ประกอบด้วย ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ดังนั้น p-value ที่น้อยกว่า 0.05 จะแสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญและมีค่าระดับของความเป็นเส้นตรงเท่ากับค่า r ที่แสดง อย่างไรก็ตาม สารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เช่น น้ำตาล aromatic amines กรดแอสคอร์บิค กรดออร์แกนิค และอื่นๆอีกมาก สามารถรีดิวซ์ Folin-Ciocalteu reagent ได้สีน้ำเงินเช่นเดียวกัน ทำให้การรายงานผลนั้นสูงเกินจริง และการวัดสีด้วยวิธีนี้ไม่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแต่อย่างใด (Huang *et al*., 2005) นอกจากนี้ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอาจแบ่งเป็น 5 กลุ่มย่อย คือ flavonols, anthocyanins, hydroxycinnamayes, flavanones, flavan-3-ols และ oligomeric procyanidins พบว่ากลุ่มของ flavanones มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมได้น้อยกว่ากลุ่มของ anthocyanins และ flavonols มาก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักผลไม้ในกลุ่มนี้จึงถูกวิเคราะห์ว่ามีน้อยกว่าอีกสองกลุ่มโดยไม่สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกที่ปรากฏอยู่จริง (Proteggente *et al*., 2002) รวมถึงการศึกษาของ Lim *et al.* (2007) ที่พบว่าลางสาดให้ปริมาณฟีนอลิกสูงเป็นอันดับสาม (100 มิลลิกรัม/100 กรัม) รองจากฝรั่งและมะเฟือง แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการใช้ DPPH และรายงานผลเป็น ascorbic acid equivalent antioxidant capacity กลับมีเพียง 14.6 มิลลิกรัม/100 กรัมหรือเป็นอันดับ 10 จากทั้งหมด 11 อันดับ ขณะที่ฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอันดับ 1 เช่นเดิม (176-218 มิลลิกรัม/100 กรัม) โดยผู้วิจัยให้เหตุผลว่าสารประกอบฟีนอลิกในลางสาด เช่น eugenol และอนุพันธุ์ของมันสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ (reversible) ส่งผลให้พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย รวมถึงอาจมีสาเหตุมาจากอัตราการเกิดปฏิกิริยากับ DPPH เกิดขึ้นช้า แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี decolorimetric assay ไม่สามารถสะท้อนความเป็นจริงได้เสมอไป

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในรูปของกรดแอสคอร์บิค พบว่า ลำดับของผลไม้ที่มีวิตามินซีมากไปหาน้อยในหน่วยของมิลลิกรัม/ลิตร ต่อผลไม้ 100 กรัม คือ ฝรั่งกลมสาลี่ (158) > ฝรั่งไร้เมล็ด (149) > มะขามเทศ (97) > มะละกอฮอลแลนด์ (61) > มะเขือเทศราชินี (37) > มะม่วงเขียวเสวยสุก (22) > มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (15) > ขนุนหนัง (14) > สับปะรดภูเก็ต (12) > กล้วยไข่ (11.5) > แก้วมังกร (6.3) > แอปเปิลแดง (3) สอดคล้องกับการศึกษาของ Corral-Aguayo *et al.* (2008) ที่พบว่าฝรั่งเนื้อแดงให้ปริมาณวิตามินซีสูงสุดเช่นกัน (222 มิลลิกรัม/100 กรัมผลไม้) แม้ว่าวิธีของการสกัดผลไม้จะต่างกัน รวมถึงการศึกษาของ Lim *et al.* (2007) ที่พบวิตามินซีสูงสุดในฝรั่งทั้งที่มีและไม่มีเมล็ด (132-144 มิลลิกรัม/100 กรัมผลไม้) รองลงมาได้แก่ มะละกอ และส้ม โดยฝรั่งและมะละกอเป็นเพียงผลไม้สองชนิดที่มีวิตามินซีสูงกว่าส้ม ขณะที่กล้วย ลางสาด และชมพู่ให้วิตามินซีน้อยสุดในการศึกษาดังกล่าว ซึ่งความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิตามินซีกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากค่า TEAC ในการศึกษานี้ พบว่ามีนัยสำคัญ ($r = 0.882$, p-value = 0.000) ดังแสดงในภาพที่ 3 ข

เมื่อพิจารณาผลไม้ในกลุ่มที่มีวิตามินอีวิเคราะห์โดยสำนักโภชนาการ กรมอนามัย (2549) พบว่าผลไม้ที่มีวิตามินอีมากไปหาน้อย ในหน่วยของมิลลิกรัม/100 กรัม ได้แก่ ขนุนหนัง (2.4) > มะขามเทศ (2.3) > มะเขือเทศราชินี (1.3) > มะม่วงเขียวเสวยสุก (1.2) > มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (1.1) > กล้วยไข่ (0.5) > แก้วมังกร (0.35) > แอปเปิลแดง (0.33) > ฝรั่งสาลี่ (0.3) > มะละกอ (0.215) > ฝรั่งไร้เมล็ด (0.21) โดยสับปะรดภูเก็ตไม่มีวิตามินอีเลย เห็นได้ชัดว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากค่า TEAC ไม่สัมพันธ์กับปริมาณวิตามินอี (ภาพที่ 2 ค และ 3 ค) ซึ่งวิตามินอี (α-tocopherol) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักที่ละลายในไขมัน ทำหน้าที่ยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid peroxidation แต่เนื่องจากวิธีวิเคราะห์แบบ decolorimetric assay วิเคราะห์ได้เฉพาะกลุ่มวิตามินที่ละลายน้ำและมีศักยภาพในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระเท่านั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก TEAC กับวิตามินอีในผลไม้จึงไม่ปรากฏความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกัน

ลำดับสุดท้ายเป็นการวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนในผลไม้โดยสำนักโภชนาการ กรมอนามัย พบว่า ผลไม้ที่มีเบต้าแคโรทีนสูงไปหาต่ำ ในหน่วยของไมโครกรัม/100 กรัม ได้แก่ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (879) > มะเขือเทศราชินี (639) > มะละกอ (482) > กล้วยไข่ (271) > มะม่วงเขียวเสวยสุก (160) > สับปะรดภูเก็ต (150) > ขนุนหนัง (77) > แอปเปิลแดง (36) > ฝรั่งกลมสาลี่ (21) โดยที่มะขามเทศ ฝรั่งไร้เมล็ด และแก้วมังกรไม่พบเบต้าแคโรทีน สอดคล้องกับ Corral-Aguayo *et al.* (2008) ที่รายงานว่ามะม่วง “Ataulfo” เป็นผลไม้ที่ให้เบต้าแคโรทีนสูงสุด (1200 ไมโครกรัม/100 กรัมผลไม้) ขณะที่ลูกแพร์ ฝรั่ง และสตรอเบอรีมีแคโรทีนอยด์ต่ำที่สุด โดยในแง่ของความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานี้ พบว่าผลไม้ที่มีเบต้าแคโรทีนสูงไม่ได้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงไปด้วย ดังแสดงในภาพที่ 2 ง) และ 3 ง) ($r = -0.337$, p-value = 0.284) เนื่องจากแคโรตินอยด์ไม่ได้เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระเปอรอกซิลที่ดีหากเทียบกับสารประกอบฟินอลิก แต่จะเป็นตัวกำจัดออกซิเจนอะตอมเดี่ยวที่ดีมากซึ่งสารประกอบฟินอลิกไม่สามารถกระทำได้ (Prior *et al.*, 2005)

ทั้งนี้ สารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตไม่ได้มีเฉพาะในสารประกอบฟินอลิกหรือในวิตามินต่างๆเท่านั้น แต่ยังมีในเอนไซม์ชนิดต่างๆเช่น superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase หรือในโมเลกุลขนาดใหญ่เช่น albumin, ceruloplasmin, ferritin และโปรตีนอื่นๆ หรือมีในฮอร์โมนเช่น estrogen, angiotensin, melatonin และอื่นๆ ในขณะเดียวกัน การทำปฏิกิริยาเพื่อต้านอนุมูลอิสระก็เกิดได้หลากหลายลักษณะ ไม่จำเป็นต้องเป็นการกำจัดอิเล็กตรอนด้วยการรีดิวซ์ (Prior *et al.*, 2005) ดังนั้น ในปี 2553 Department of Agriculture ของสหรัฐอเมริกา (USDA) จึงได้ยกเลิกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอาหารที่วิเคราะห์ด้วยวิธี oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay ออกจากฐานข้อมูลห้องปฏิบัติการทางอาหาร ด้วยเหตุผลที่ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์ดังกล่าวรวมถึงการรายงาน

ปริมาณโพลีฟีนอลในอาหาร ไม่สามารถบ่งบอกถึงผลกระทบกับสุขภาพมนุษย์หรือไม่สามารถอธิบายถึงกลไกเมตาโบลิซึมที่เกิดขึ้นภายในร่างกายมนุษย์อย่างถ่องแท้ได้ รวมถึงกลไกที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระก็อาจมีบทบาทในการป้องกันหรือการทำลายสุขภาพ ดังนั้นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (in vitro) จึงไม่อาจนำมาคาดการณ์ถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย (in vivo) ซึ่งนอกจาก ORAC assay แล้ว วิธีการวิเคราะห์อื่นๆเช่น ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay และ TEAC assay ซึ่งมีพื้นฐานมาจากการใช้อนุมูลอิสระที่ต่างกันหรือใช้ตัวออกซิแดนท์ในการสร้างอนุมูลอิสระที่ต่างกัน ส่งผลให้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ตัวเลขที่ต่างกันจนไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันอีกด้วย (USDA, 2012)

สรุปผลการวิจัย

วิธี decolorimetric assay สามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้เฉพาะกลุ่มที่มีความสามารถในการรับ-ให้อิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระในกลุ่มเปอรอกซิลเท่านั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายในไขมัน เช่น วิตามินอี หรือกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการกำจัดออกซิเจนอะตอมเดี่ยว เช่น เบต้าแคโรทีน ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้ การนำเสนอลำดับของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี decolorimetric assay จึงต้องพิจารณาถึงข้อจำกัดของวิธี มิฉะนั้นจะสร้างความเข้าใจที่ผิดพลาดและคลาดเคลื่อนให้แก่ผู้บริโภคได้

เอกสารอ้างอิง

คู่มือปฏิบัติการของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2556). *วิชา 2314415 ปฏิบัติการเคมีอาหาร 2*, (หน้า 30-31). กรุงเทพมหานคร.

สำนักโภชนาการ กรมอนามัย. (2549). *องค์ความรู้เรื่องปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในผลไม้เพื่อส่งเสริมสุขภาพ (วิตามินซี วิตามินอี และ เบต้าแคโรทีน) ในผลไม้*. วันที่ค้นข้อมูล 3 มกราคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://nutrition.anamai.moph.go.th/temp/main/view.php?group=3&id=117

Asghar, M.N., Khan, I.U., Arshad, M.N., & Sherin, L. (2007). Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay. *Acta Chimica Slov*enica, *54*, 295-300.

Corral-Aguayo, R., Yahia, E.M., Carrillo-Lopez, A., & González-Aguilar, G. (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 10498-10504.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(3), 1035-1040.

Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Alfarez, M-J., & Vazquez, C. (1998). The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. *Nutrition*, *14*, 513-520.

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

Lim, Y.Y., Lim, T.T., & Tee, J.J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. *Food Chemistry, 103*(3), 1003-1008.

Machlin, L.J, & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1*, 441-445.

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

Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S., Van de Put, E. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radicaks Research, 36*(2), 217-233.

Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, *8*(3), 121-137.

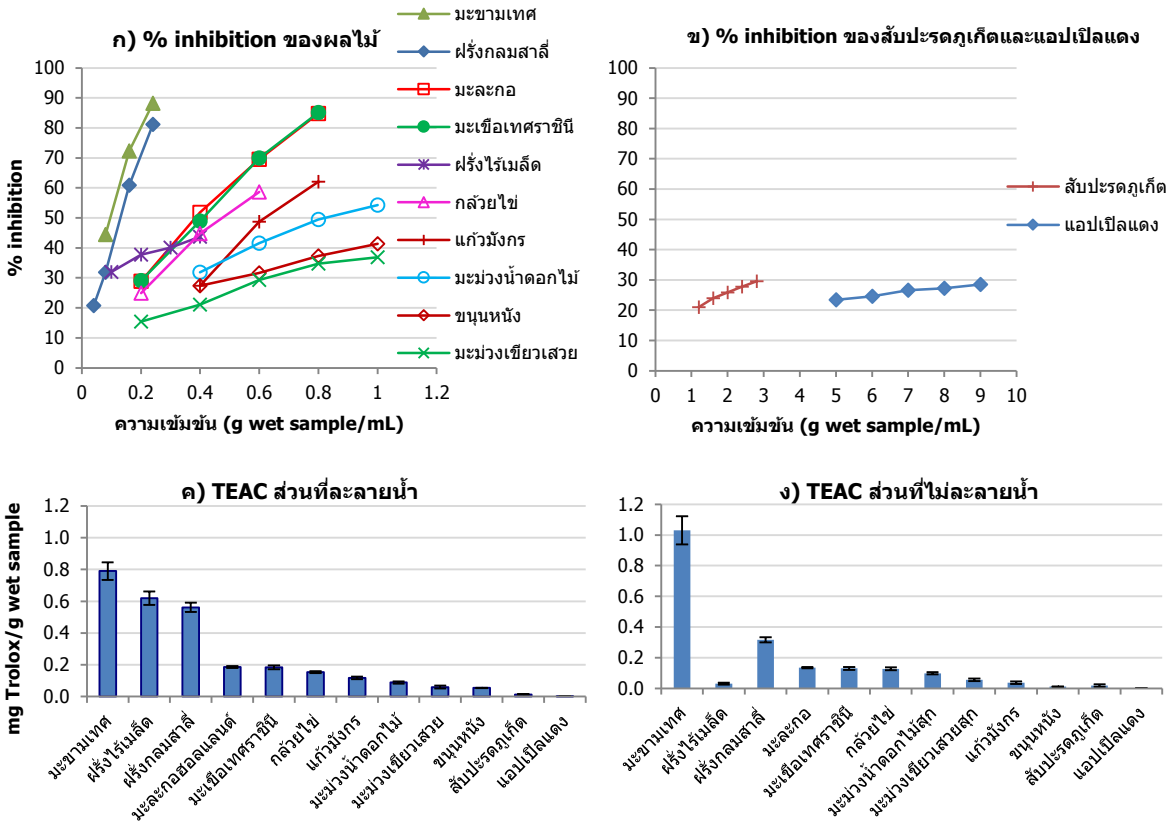
Scalfi, L., Fogliano, V., Pentangelo, A., Graziani, G., Giordano, I., Ritieni, A. (2000). Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of *Corbarini* small tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 1363-1366.

USDA. (2012). *Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010)*. Retrieved on January 3, 2014, from http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm? docid=15866&pf=1

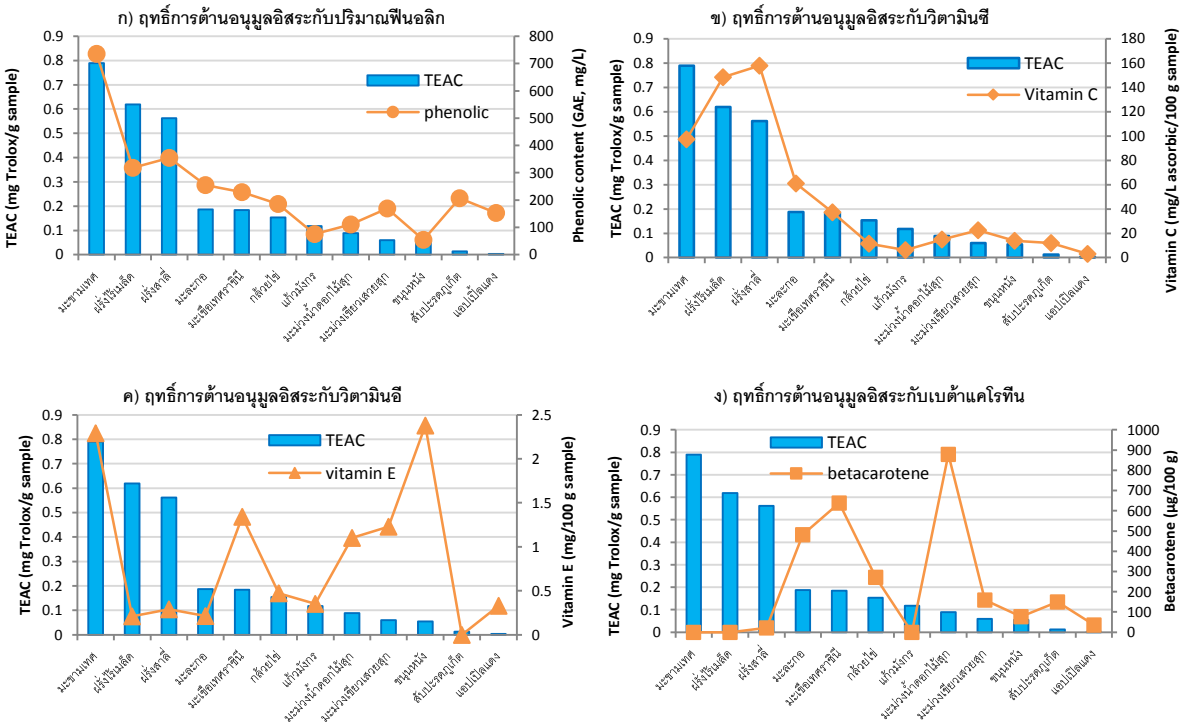
Waterhouse, A.L. (2002). *Determination of total phenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry I1.1.1-I1.1.8*. New York: John Wiley & Sons.

Wikipedia. (2013). *Free-radical theory of aging.* Retrieved on January 3, 2014, from http://en.wikipedia.org/wiki/Free-radical_theory_of_aging

Wikipedia. (2014). *Antioxidant*. Retrieved on January 3, 2014, from http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant

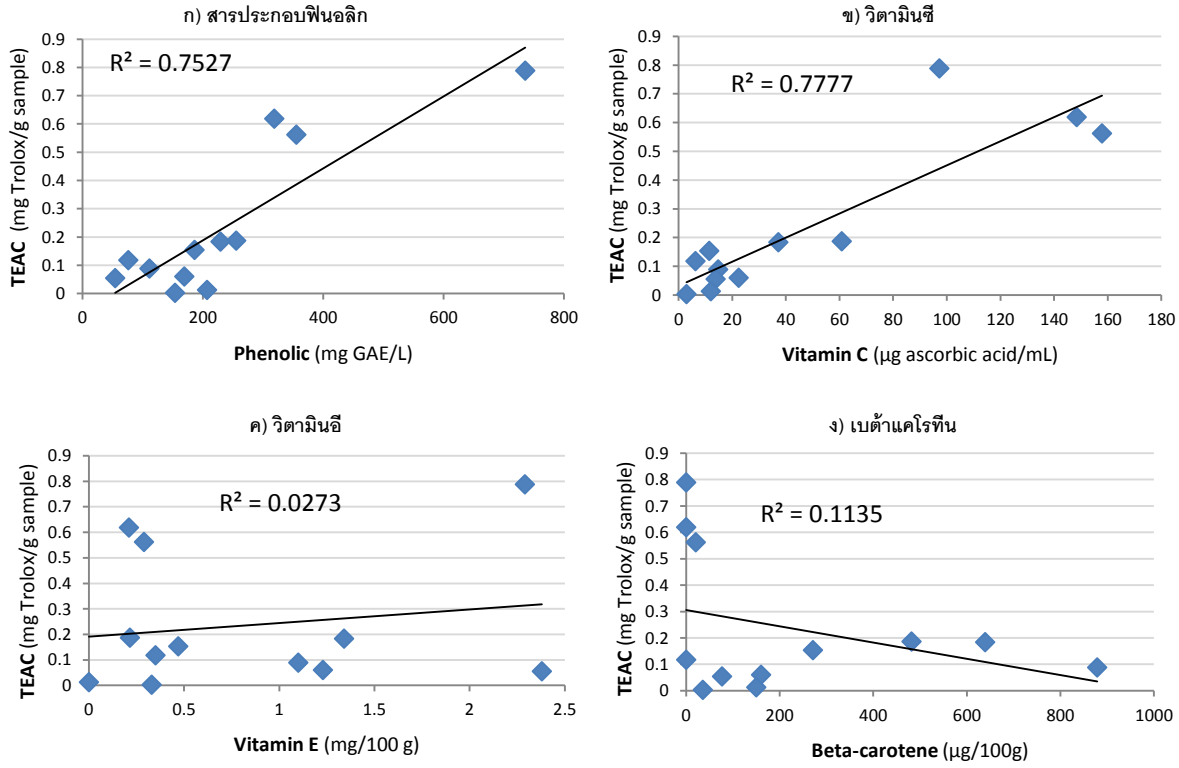


ภาพที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ในรูปของ $IC_{50\%}$ และ TEAC



หมายเหตุ ข้อมูลวิตามินอีและเบต้าแคโรทีน มาจากสำนักโภชนาการ กรมอนามัย (2549)

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟีนอลิก วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีนในผลไม้



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ TEAC กับปริมาณฟีนอลิก วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีนในผลไม้