

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของผงถั่วดาวอินคาแบบดิบ และผงถั่วดาวอินคาแบบสุก ด้วยวิธี

DPPH assay

The Study of Antioxidant in Raw Sacha Inchi Powder and Cooked Sacha Inchi Powder by

DPPH Assay

กนกศักดิ์ แสงจันทร์

kay.kankawee@gmail.com

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. วิจิตร บุญยะโหดระ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

ดาวอินคา (*Plukenetia volubilis* L.) หรือ Sacha inchi เป็นพืชท้องถิ่นในป่าเขตร้อนแถบทวีปอเมริกาใต้ เมล็ดของพืชชนิดนี้เป็นแหล่งของกรดไขมัน โทโคฟีรอล และสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผงดาวอินคาแบบดิบ และผงดาวอินคาแบบสุก ด้วยวิธี DPPH โดยนำตัวอย่างทั้งสองปริมาณ 1 กรัม หมักด้วยเอทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปตกตะกอนอีกครั้ง นำสารสกัดส่วนใสที่ได้ 1,000 ไมโครลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร มีสารวิตามินซีเป็นตัวควบคุมเชิงบวก ซึ่งพบว่าสารสกัดผงดาวอินคาแบบดิบ และแบบสุกที่ความเข้มข้น 1 g/mL มีฤทธิ์การยับยั้งเท่ากับ $93.62 \pm 0.20\%$ และ $93.29 \pm 0.48\%$ ขณะที่วิตามินซีที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์การยับยั้งเท่ากับ 28.33 ± 1.25 , 38.53 ± 0.58 , 60.20 ± 0.05 , 79.33 ± 0.31 และ 94.13 ± 0.37 ตามลำดับ เมื่อทดสอบผลทางสถิติด้วยวิธี

one-way ANOVA ที่ความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) พบว่าสารสกัดผงดาวอินคาแบบดิบ สกัดสกัดผงดาวอินคาแบบสุก และวิตามินซี ($10 \mu\text{g/mL}$) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: Plukenetia volubilis/Sacha Inchi/ผงถั่วดาวอินคา/ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน/DPPH.

ABSTRACT

Plukenetia volubilis is commonly known as Sacha inchi. The seeds of this plant are rich sources of fatty acid, tocopherols and phenolic compounds which has antioxidant properties. In this study our purpose to determine the antioxidant activity of raw and cooked Sacha inchi extracts by using DPPH assay. The powdered of raw and cooked Sacha inchi 1 g were macerated in 1mL of ethanol for 4 hr. and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The obtained supernatant solution was then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The extracted 1,000 μL of the supernatant from this section was used for the determination of antioxidant activity by using DPPH assay and measured absorbance at 517 nm. The ascorbic acid used as positive control. The results showed that both raw and cooked Sacha inchi at a concentration of 1 g/mL had an antioxidant activity with the %inhibition of $93.62 \pm 0.20\%$ and $93.29 \pm 0.48\%$ while the ascorbic acid at a concentration of 2, 4, 6, 8 and 10 $\mu\text{g/mL}$ have $28.33 \pm 1.25\%$, $38.53 \pm 0.58\%$, $60.20 \pm 0.05\%$, $79.33 \pm 0.31\%$ and $94.13 \pm 0.37\%$, respectively. In addition, the results of the antioxidant activity of both extracts and ascorbic acid 10 $\mu\text{g/mL}$ were not significantly different at $p < 0.05$ according to one-way ANOVA

Keywords: *Plukenetia volubilis*/Sacha inchi/Antioxidant/DPPH

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

เนื่องด้วยสภาวะสิ่งแวดล้อม และสังคมในประเทศไทยที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบัน ทำให้ประชากร มีพฤติกรรมการบริโภค และการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกับสังคมตะวันตกมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้ร่างกายได้รับสารพิษในรูปแบบต่างๆ เช่น การทำงานของสารชีวโมเลกุลเกิดความบกพร่อง ทำลาย โครงสร้างดีเอ็นเอ เปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์สร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนทำให้โปรตีนทำงานผิดปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหรือเหนี่ยวนำให้เกิด

โรคภัยหลายชนิด เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง ความเสื่อมของเซลล์ประสาท ภาวะความชรา (วัลลภ และประณีต, 2547 และชัยรัตน์, 2552) ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่น (wrinkle) และเกิดเป็นจุดสี (lipofuscin spot) เป็นต้น (Papus, 1998) สาเหตุของโรคเหล่านี้ส่วนหนึ่งมาจากการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกายมากเกินไป และจะก่ออันตรายแก่ร่างกาย กล่าวคือสภาวะที่ระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระไม่อยู่ในระดับสมดุล ปริมาณสารอนุมูลอิสระมีมากเกินไปปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสภาวะนี้เรียกว่า “สภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล” (oxidative stress) ทำให้ก่อเกิดอันตรายกับร่างกาย อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะทำลายหรือทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากผลพลอยได้ของการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์รวมทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ รังสียูวี (UV ray) มลพิษ (Pollution) เชื้อโรค (Pathogen) โอโซน (ozone) ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ (Smoke) (Denisov, 2006; Scott et al, 2004) ทำให้ง่ายต่อการทำลายของเซลล์ และทำให้เกิดความเสียหายต่อระดับเซลล์ต่อไป ความเสียหายจากการเกิดอนุมูลอิสระทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานต่างๆ ของเซลล์ในร่างกายได้ เป็นสาเหตุของความแก่และนำไปสู่การก่อกลายพันธุ์ของเซลล์ต้นกำเนิด มะเร็ง (Ames et al., 1993) โดยทั่วไปอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอื่น ทำให้เกิดอนุมูลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูงต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์สามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ร่างกายจึงต้องมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ขึ้นมาเพื่อจับสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยกลไกในการต้านอนุมูลอิสระมีหลากหลายรูปแบบ เช่น การเข้าดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การจับกับโลหะ ที่ก่อให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การเสริมฤทธิ์ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (บุหรณ์, 2556)

ปัจจุบันในประเทศไทยนิยมนำพืชสมุนไพร ผัก และผลไม้จากต่างประเทศเข้ามาปลูกเป็นจำนวนมากชนิดซึ่งหนึ่งนั้น คือ ถั่วดาวอินคา (*Plukenetia volubilis* L. หรือ *Sacha inchi*) จากการศึกษาวិจัยพบว่า ในเมล็ดของถั่วดาวอินคาเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยไขมันและโปรตีน มีกรดไขมันโอเมก้า 3 และ โอเมก้า 6 ในปริมาณสูง (Hamaker et al., 1992) และมีสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น Tocopherols (Fol-legatti-Romero, Piantino, Grimaldi & Cabral, 2009), Carotenes (Ha-maker

et al., 1992), สารประกอบโพลีฟีนอล (Fanali et al., 2011) และ Phytosterols (Bondioli, Della Bella, & Rettke, 2006) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ดาวอินคาเป็นพืชมีดอกสีเขียวสดขนาดเล็ก เมื่อฝักแก่เต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ฝักมักมี 4-6 แฉก เมล็ดมีขนาดกว้าง 15-20 มิลลิเมตร หนา 7-8 มิลลิเมตร น้ำหนัก 0.8-1.4 กรัม มีถิ่นกำเนิดอยู่ใน ป่าอะเมซอน เดบโตในสภาพอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 10-36 องศาเซลเซียส เมล็ดดาวอินคาที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้วจะเหลือกากหรือผงของถั่วดาวอินคา ซึ่งในปัจจุบันเกษตรกรได้นำไปผสมลงในอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งและเลี้ยงไก่ และผลผลิตที่ได้จากก้างและไถ่นั้น พบว่าเนื้อก้างมีปริมาณของโอเมก้า 3 เพิ่มขึ้น และไขไถ่ก็มีปริมาณของโอเมก้า 3 เพิ่มขึ้นเช่นกัน และจากการศึกษาและทบทวนวรรณกรรม ในประเทศไทย ยังไม่พบว่ามีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ของกากหรือผงถั่วดาวอินคาที่มีการสกัดน้ำมันออกแล้ว ด้วยเครื่องสกัดเย็น 100% (100% Pure Cold Press) เครื่องสกรูเพรส (Screw Oil Press) และนำไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยความร้อน โดยงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสนใจศึกษาเรื่องฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของผงดาวอินคาแบบสุก และผงดาวอินคาแบบดิบ ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ DPPH

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า Inca peanut, wild peanut, sacha peanut หรือ mountain peanut เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae. (Guil-lén, Ruiz, Cabo, Chirinos, & Pascual, 2003; Gutiérrez, Rosada, & Jiménez, 2011; Hamaker et al., 1992; Krivankova et al., 2007) ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองในป่าเขตร้อนของประเทศเปรูในอเมริกาใต้ที่ระดับความสูงระหว่าง 200 ถึง 1500 ม. (Semino et al., 2008) ดาวอินคาเป็นไม้เถาทรงพุ่ม เจริญเติบโตที่ระดับความสูง 2-3 เมตร เป็นพืชที่ต้องการแสงแดดและความชื้นสูง ผลเป็นรูปดาวมี 4-6 แฉก ตอนหนุ่มเป็นฝักสีเขียว และเมื่อฝักแก่เต็มที่จะมีสีน้ำตาลเข้ม มีเปลือกหุ้มเมล็ด 3 ชั้น หนึ่งฝักมีเมล็ด 3-7 เมล็ด เป็นพืชไม้เลื้อยมีอายุยืนถึง 10-50 ปี ซึ่งตอนนี้ยังมีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลาย ในภาคเหนือของประเทศไทย และในประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคลุ่มแม่น้ำโขง ต้นถั่วดาวอินคาสามารถเก็บเกี่ยวได้ตลอดปีจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่ให้ผลผลิตค่อนข้างสูงเป็นพืชชนิดใหม่ที่มีคุณค่า และน่าสนใจ

เมล็ดของถั่วดาวอินคาเป็นแหล่งของสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Rodríguez et al. 2010) และยังถูกใช้เป็นยาเพื่อรักษาปัญหาเกี่ยวกับโรคไขข้อและปวดกล้ามเนื้อ เนื่องจากอุดมด้วยสารอาหารและกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย เมล็ดถั่วดาวอินคาประกอบด้วยเปลือกประมาณ 33-35% เนื้อในเมล็ดประมาณ 65-67% (Hamaker et al., 1992) และพบองค์ประกอบของโปรตีนประมาณ 25-30%, น้ำมัน 35-60% กรดไขมันจำเป็น แร่ธาตุ วิตามินอี (Chirinos et al., 2013;

Gutiérrez, Rosada, & Jimenez, 2011; Hamaker et al., 1992) ที่มีคุณสมบัติช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (Follegatti-Romero et al., 2009), Carotenes (Hamaker et al., 1992) ส่วนประกอบอื่นๆ ที่พบได้แก่ Polyphenolic compounds, Phytosterols เมล็ดถั่วดาวอินคาเป็นแหล่งของกรดไขมันจำเป็น ประกอบด้วยกรด linoleic 34% (โอเมก้า 6) และกรด linolenic 51% (โอเมก้า-3) ตามลำดับ (Hamaker et al., 1992; Gutierrez et al., 2011; Chirinos et al., 2015)

ถั่วดาวอินคาเป็นแหล่งของโปรตีนสูง โดยเฉพาะโปรตีน albumin ที่ละลายในน้ำได้พบได้ 1 ใน 3 ของโปรตีนทั้งหมด (Hanssen & Hubsch, 2011) และพบโทโคฟีรอล (Tocopherol) ในปริมาณสูง ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่รุนแรง ป้องกันการเกิด lipid peroxidation นอกจากนี้เมล็ดถั่วดาวอินคา (*Plukenetia volubilis* L. หรือ *sacha inchi*) ยังเป็นแหล่งของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) โดยเฉพาะ Alpha-Linolenic Acid และ Linoleic Acid ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในร่างกายมนุษย์ต่อระบบต่างๆ เช่น ช่วยป้องกัน โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Cardiovascular Disease) ต่อต้านโรคข้อรูห์มาตอย (Rheumatoid Arthritis) ช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและมะเร็ง มีสารต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) (Chirinos et al., 2013)

ในส่วนของเปลือกและเมล็ดพบกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคุณสมบัติป้องกันหลอดเลือดแข็งตัว (Anti-Atherogenic) และต้านการแข็งตัวของเลือด (Anti-Thrombogenic) ถั่วชนิดนี้เป็นแหล่งของน้ำมัน (35-60%) และโปรตีน (27%) ในปริมาณสูงโดยเฉพาะโปรตีน albumin ที่ละลายในน้ำได้พบได้ 1 ใน 3 ของโปรตีนทั้งหมด ใบใช้ปรุงอาหารและบริโภคเมล็ดใช้รักษาโรคได้ (Hanssen & Hubsch, 2011) นอกจากนี้ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) ที่พบในถั่วดาวอินคา สามารถลดคอเลสเตอรอล ในเส้นเลือดและลดความเสี่ยงต่อโรคมะเร็ง อีกทั้งโทโคฟีรอล (Tocopherol) ที่มีในปริมาณสูงยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่รุนแรง ป้องกันการเกิด lipid peroxidation และในเนื้อเยื่อของใบถั่วดาวอินคา (*Plukenetia volubilis* L. หรือ *sacha inchi*) ยังมีสารเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) ซาโปนิน (Saponin) ฟีนอลิก (Phenolic) และสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่สามารถต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Anti-Proliferative Activity) ได้ (Chirinos et al., 2013)

งานวิจัยเรื่อง Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity ได้ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบในถั่วดาวอินคาจากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งพบว่า มีส่วนประกอบที่เป็น alpha linolenic acid ร้อยละ 37.3-44.2 และ linoleic acid ร้อยละ 35.2-41 และยังพบส่วนประกอบ ที่เป็นไขมันอื่นๆ อีก เช่น PUFA 78-81.1%, MUFA 10.8-13.2%, saturated fatty acid 7.9-9.1% สัดส่วนของ alpha

linolenic acid (กรดไขมันโอเมก้า 6) ต่อ linoleic acid (กรดไขมันโอเมก้า 3) อยู่ในช่วง 0.83-1.09 และส่วนประกอบอื่นๆที่พบ ได้แก่ tocopherols (vitamin E), polyphenolic compounds, phytosterols กรดอะมิโน เช่น cysteine, tyrosine, threonine และ tryptophan (Rosana et al., 2013)

งานวิจัยเรื่อง Chemical composition and oxidative evolution of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil from Xishuangbanna (China) ได้ทำการศึกษาส่วนประกอบของน้ำมัน สกัดดาวอินคาจากแหล่งเพาะปลูกประเทศจีน ศึกษาพบว่ามีส่วนประกอบ ได้แก่ palmitic acid ร้อยละ 4.40 ± 0.34 , stearic acid ร้อยละ 3.12 ± 0.06 , oleic acid ร้อยละ 9.29 ± 0.32 , linoleic acid ร้อยละ 39.57 ± 0.20 และ linolenic acid ร้อยละ 43.52 ± 0.92 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้า ที่พบว่า ส่วนประกอบหลักของน้ำมันสกัดดาวอินคาคือ linoleic acid และ linolenic acid (Liu et al., 2014) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระในผงดาวอินคาแบบดิบ และ ผงดาวอินคาแบบสุก ด้วยวิธี DPPH

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หมายถึง สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถป้องกัน ชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ โดยทั่วไปสามารถแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นประเภทใหญ่ 5 ประเภท ดังนี้

1. Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) รวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติสังเคราะห์ ซึ่งสารในกลุ่มนี้ ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอน

2. Oxygen scavenger สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้ สารในกลุ่มนี้เช่น กรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี

3. Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ Lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร สารในกลุ่มนี้เช่น Dilauryl thiopropionate และ Thiopropionic acid

4. Enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สารกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ auxillary antioxidant enzyme

5. Chelating agent หรือ Sequestrant สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริม และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร สารในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดซิตริก กรดอะมิโน เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลเป็นสารสำคัญที่พบมากตามธรรมชาติทั้งพืช ผัก และผลไม้ โดยมีรายงานว่า พบสารกลุ่มฟีนอลิก (Fanali et al., 2011) และไฟโตสเตอรอลในเมล็ดถั่วดาวอินคา (Blondioli, Della Bella, & Rettke, 2006) โพลีฟีนอลเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญโดยมีฤทธิ์ ด้านแบคทีเรีย ด้านไวรัส ด้านการอักเสบและการแพ้ รวมถึงการมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และลดความดันโลหิตจากฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวสอดคล้องกับคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (โอภา และคณะ, 2549) สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) มีจำนวน Hydroxyl group อย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่าในโมเลกุล มีคุณสมบัติที่ได้รับการสนใจเป็นอันมากที่เห็นได้ในปัจจุบัน คือการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ (Diphenyl - picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คือ อนุมูลอิสระ ดีฟิฟิเอซ (DPPH•, diphenyl-picrylhydrazyl radical) เป็นสารสังเคราะห์ของรูปอนุมูลอิสระ ที่คงตัว มีสีม่วง ชูดกลืนแสงได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลืองซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณค่าที่ลดลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

สำหรับโครงการวิจัยครั้งนี้ เป็นการวิจัยในรูปแบบเชิงทดลอง โดยพืชที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์คือ พงดาวอินคาแบบสุก และพงดาวอินคาแบบดิบ จากเกษตรกรที่ผ่านกระบวนการสกัดเย็นแบบ 100% ด้วยเครื่องสกรูเพรส แล้วปล่อยให้ตกตะกอน จากนั้นจึงนำมาผ่านการกรองด้วยเครื่องกรอง (Filter Oil Press) เพื่อแยกส่วนของน้ำมันถั่วดาวอินคาออกจากส่วนที่เป็นกาก จากนั้นนำส่วนกากหรือผงที่ได้หลังจากการสกัดน้ำมันเสร็จแล้ว นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดผงดาวอินคา นำผงดาวอินคาแบบดิบ และผงดาวอินคาแบบสุก ที่ได้หลังจากการสกัดน้ำมันออกแล้วข้างต้น ซึ่งให้ได้ปริมาณอย่างละ 5 กรัม ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 mL หลังจากนั้นทำการสกัดด้วยการเติมตัวทำละลาย 95% เอทานอล ปริมาตร 5 mL (หรือ อัตราส่วน 1:1 %w/v) หลังจากนั้นทำการสกัดโดยวิธีการสกัดแบบการหมักเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้อง นำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบของการหมุนขนาด 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลาย ไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีทดสอบ DPPH

2. การทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดเอทานอลผงดาวอินคาด้วยวิธี DPPH นำสารสกัดเอทานอลผงดาวอินคาแบบดิบ และแบบสุก ซึ่งได้จากขั้นตอนการเตรียมข้างต้น มาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการทดสอบแบบ DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl radical scavenging)

ในการทดสอบครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสารสกัดเอทานอลผงดาวอินคาแบบดิบ และผงดาวอินคาแบบสุก ที่ความเข้มข้น 1 g/mL เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม และการทดสอบดังต่อไปนี้

2.1 เตรียมสารละลาย DPPH ชั่งสาร DPPH ปริมาณ 0.0079 g ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 mL จากนั้นทำการเติม 95% เอทานอล ประมาณครึ่งหนึ่งของ volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วย 95% เอทานอลเพื่อให้ได้สารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.2 mM DPPH 1000 mL

2.2 เตรียมสารมาตรฐาน ascorbic acid ทำการเตรียมสารละลาย stock solution ของ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสาร ascorbic acid ปริมาณ 1 mg ละลายด้วยน้ำ DI water ปริมาตร 1 mL หลังจากนั้นนำ stock solution ของสารละลายที่ได้ ทำการเจือจางด้วย DI water เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL และ 10 µg/mL ตามลำดับ

2.3 วิธีการทดสอบ นำสารสกัดที่ได้จากการเตรียมข้างต้นปริมาตร 1000 µL ทำการเติมสารละลาย 0.2 mM DPPH ปริมาตร 1000 µL แล้วนำสารละลายที่ได้ไปบ่มในตู้มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างทดสอบไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer โดยใช้ 95% เอทานอล เป็น blank ของการทดสอบ

2.4 วิธีการคำนวณหาค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ทำการคำนวณหาค่าฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน หรือ % inhibition โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

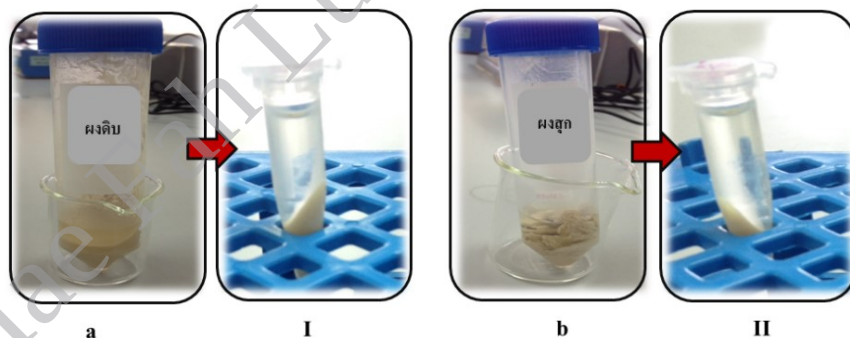
A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (control)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดที่ทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ($R=3$) จากนั้นนำข้อมูลผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ย และค่าวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) เพื่อแสดงฤทธิ์ที่ได้ในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ SD วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Tukey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย (Results)

ผลการเตรียมสารสกัดเอทานอลผงถั่วดาวอินคาแบบดิบและแบบสุกปริมาณอย่างละ 5 กรัม ในหลอดทดสอบที่มีปริมาตรตัวทำละลาย 95% เอทานอล (5 mL) หรือในอัตราส่วน 1:1 %w/v หลังจากทำการสกัดโดยวิธีการสกัดแบบการหมักนาน 4 ชั่วโมง จนได้สารสกัดที่ตกตะกอนใสที่มีความเข้มข้น 1 g/mL ของผงถั่วดาวอินคาแบบดิบ และผงถั่วดาวอินคาแบบสุก



ภาพที่ 1 แสดงสารสกัดเอทานอล a) ผงถั่วดาวอินคาแบบดิบ b) ผงถั่วดาวอินคาแบบสุก และสารสกัดหลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ของ I) ผงถั่วดาวอินคาแบบดิบ และ II) ผงถั่วดาวอินคาแบบสุก

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดเอทานอลผงถั่วดาวอินคาแบบคิบและผงถั่วดาวอินคาแบบสุก



ภาพที่ 2 แสดงสีของปฏิกิริยาของสารสกัดเอทานอลผงถั่วดาวอินคาแบบคิบ (1 g/mL), สารสกัดผงถั่วดาวอินคาแบบสุก (1 g/mL), สารควบคุมมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 10 µg/mL หลังทำการบ่มในสารละลาย DPPH ในที่มืดนาน 30 นาที

จากผลการทดสอบในตารางที่ 1 พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 g/mL หรือ 1×10^6 µg/mL ของสารสกัดเอทานอลผงถั่วดาวอินคาแบบคิบและผงถั่วดาวอินคาแบบสุก มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ $93.62 \pm 0.20\%$ และ $93.29 \pm 0.48\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ตัวควบคุมมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, และ 10 µg/mL มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ $28.33 \pm 1.25\%$, $38.53 \pm 0.58\%$, $60.20 \pm 0.05\%$, $79.33 \pm 0.31\%$ และ $94.13 \pm 0.37\%$ ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับตัวควบคุมมาตรฐาน ascorbic acid พบว่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองดังกล่าวมีฤทธิ์มากกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น ≤ 8 µg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน $\leq 79.33 \pm 0.31\%$ แต่พบว่าสารสกัดผงถั่วดาวอินคาแบบคิบที่ความเข้มข้น 1×10^6 µg/mL สารสกัดผงถั่วดาวอินคาแบบสุกที่ความเข้มข้น 1×10^6 µg/mL และสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน ซึ่งพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเอทานอลผงถั่วดาวอินคาแบบคิบและผงถั่วดาวอินคาแบบสุกที่ความเข้มข้น 1×10^6 µg/mL ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับสาร ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL และฤทธิ์ของถั่วดาวอินคา

แบบดิบ และถั่วดาวอินคาแบบสุก มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 1 ค่าฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดผงถั่วดาวอินคาแบบดิบ, สารสกัดผงถั่วดาวอินคาแบบสุก และสารควบคุมมาตรฐาน ascorbic acid ด้วยวิธีทดสอบ DPPH

ตัวอย่างทดสอบ	Absorbance			%inhibition [†]
	R1	R2	R3	
Ascorbic acid (2 $\mu\text{g/mL}$)	0.900	0.879	0.870	28.33 $\pm$ 1.25 ^a
Ascorbic acid (4 $\mu\text{g/mL}$)	0.765	0.756	0.751	38.53 $\pm$ 0.58 ^b
Ascorbic acid (6 $\mu\text{g/mL}$)	0.491	0.490	0.490	60.20 $\pm$ 0.05 ^c
Ascorbic acid (8 $\mu\text{g/mL}$)	0.252	0.235	0.259	79.33 $\pm$ 0.31 ^d
Ascorbic acid (10 $\mu\text{g/mL}$) ^{††}	0.068	0.072	0.077	94.13 $\pm$ 0.37 ^e
สารสกัดผงถั่วอินคาแบบดิบ (1x10 ⁶ $\mu\text{g/mL}$)	0.081	0.079	0.076	93.62 $\pm$ 0.20 ^e
สารสกัดผงถั่วอินคาแบบสุก (1x10 ⁶ $\mu\text{g/mL}$)	0.102	0.099	0.089	93.29 $\pm$ 0.48 ^e
Control	1.249	1.231	1.216	-

† แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (R=3), ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ด้วยวิธีทดสอบแบบ one way ANOVA และเทียบความต่างด้วย Tukey's HSD test

†† ค่า IC₅₀ ของ Ascorbic acid เท่ากับ $4.96 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ(Discussion and Suggestion)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการทดสอบ แบบ DPPH ของสารสกัดเอทานอลผงถั่วดาวอินคาทั้งแบบดิบและแบบสุกที่ความเข้มข้นการสกัด 1 g/mL พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ โดยมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ

93.62±0.20%, 93.29±0.48% และ 94.13±0.37% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทดสอบ ที่ทดสอบด้วย one-way ANOVA ที่ความเชื่อมั่น 95% และพบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ของสารสกัดผงถั่วดาวอินคาแบบดิบและแบบสุกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, และ 8 µg/mL ตามลำดับ และฤทธิ์ของถั่วดาวอินคาแบบดิบ และถั่วดาวอินคาแบบสุก มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้น 1 g/mL ซึ่งฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวอาจมาจากการที่ผงถั่วดาวอินคา มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ วิตามิน อี และสารกลุ่ม phenolic compounds อื่นๆ จากผลการทดสอบครั้งนี้พบว่าสารสกัดทั้งสองมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากที่สกัดกัสดังกล่าวมีส่วนประกอบของ สาร phenolic compounds และ วิตามิน อี ซึ่งมีการรายงานก่อนหน้านี้มากมายเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Traber & Atkinson, 2007) (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997; Ryan et al., 2010; Wolf, 2005)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือได้ว่าเป็นการศึกษาวิจัยขั้นพื้นฐานที่สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปทำการศึกษต่อยอดเนื่องจากค่าการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้มีค่าเทียบเท่า ascorbic acid ที่ 10 µg/mL และเป็นไปได้ว่าในการศึกษาครั้งต่อไป จะสามารถแสดงค่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยค่า IC₅₀ เพื่อที่จะสามารถทราบค่าที่แท้จริงของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แล้วทำการเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารสกัดทั้งแบบดิบและแบบสุก ซึ่งจะช่วยให้ทราบว่าสารสกัดทั้งสองแบบไหนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่ากัน หรือแม้กระทั่งเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ได้กับสารมาตรฐานอื่น ๆ ที่ใช้รูปแบบการทดสอบแบบเดียวกันนี้ เพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลที่ได้นี้ไปศึกษาต่อยอดหรือทำการพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์สุขภาพในลำดับต่อไป

รายการอ้างอิง

กิตติพัฒน์ ไสภิตธรรมคุณ, ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลป์ชาญ. (2560). *การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร*. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, 86 ว, ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน

เจนจิรา จิรมย์, ประสงค์ สีหานาม. (2554). *อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา*. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี, ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 พ.ค.-ส.ค., ISSN 2229-2276

บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, ปีที่ 21 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน

บังอร วงศ์รักษ์, ศศลักษณ์ ปิยะสุวรรณ. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. ปริญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล

ปิยศิริ สุนทรนนท์ (2551). ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในดอกดาหลา. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีวเคมี) สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปิยศิริ สุนทรนนท์, อุบล ต้นสม, สมภพ เกาทอง. (2557). การศึกษากิจกรรมต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆ ของผลพลึงกาสา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

พินิจ แจ็กอิน, ไสริยา แก้วลา. (2556). การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก (พันธุ์พิษณุโลก 2 และ พันธุ์พวงเงิน)

รวินิภา ศรีมูล, ศิริจันทร์ ตาใจ. (2556). ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้แปรรูปใน จังหวัดจันทบุรี. คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก, วิทยาเขตจันทบุรี

วัลลภ วิชะรังสรรค์, ประณิต โอปณะโสภิต. (2547). ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง. ศรีนครินทร์วิโรฒเภสัชสาร, 9(1), 73-80.

อรรวรรณ กริ่งเกษมศรี. (2555). ปริมาณสาร โพลีฟีนอล และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของเปลือกและเมล็ดของผลไม้ไทย. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen. T. M. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.

- Chirinos, R., Necochea, O., Pedreschi, R. & Campos, D. (2016). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell: an alternative source of phenolic compounds and antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 986-993
- Chirinos, R., Zuloeta, G., Pedreschi, R., Mignolet, E., Larondelle, Y. & Campos, D. (2013). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141, 1732-1739
- Gill, I., & Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acid: Part 1. Occurrence, biological activities and application. *Trends Biotechnol.* 15, 401-409
- Liu, Q., Xu, Y. K., Zhang, P., Na, Z., Tang, T. & Shi, Y. X. (2014). Chemical composition and oxidative evolution of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil from Xishuangbanna (China). *Grasas Y Aceites*, 65(1), 1-9
- Nawar, W. W. (1996). Lipid. In O. R. Fennema (eds.), *Food Chemistry* (pp. 210-243). New York: n.p.
- Nascimento, A., Melo-Silveira, R., Dantas-Santos, N., Fernandes, J., Zucolotto, S., Rocha, H., & Scortecchi, K. (2013). Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (*Euphorbiaceae*). <http://dx.doi.org/10.1155/2013/950272>
- Paul H. (2015). An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells. *Applications Department*, BioTek Instruments, Inc.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159. doi:[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Ryan, M. J., Dudash, H. J., Docherty, M., Geronilla, K. B., Baker, B. A., Haff, G. G., . . . Alway, S. E. (2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves

antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental gerontology*, 45(11), 882-895. doi:10.1016/j.exger.2010.08.002

Saroat, R., Murdayanti, D., Sunantha, K. & Suphat, P. (2016). Chemical properties and nutritional factors of pressed-cake from tea and sacha inchi seeds. *Food Bioscience*, 15, 64-71

Sayanova, O. V., & Napier, J. A. (2004). Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry*. 65, 147-158

Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology & medicine*, 43(1), 4-15. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024

Wolf, G. (2005). The Discovery of the Antioxidant Function of Vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 363-366. doi:10.1093/jn/135.3.363

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.*, 54(3), 176-86.