# ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองของน้ำส้มจาก (Nipa palm vinegar)

**อุดมรัตน์ วัฒนสิทธิ์, สุภาภรณ์ ยิ้มเที่ยง และวิยดา กวานเหียน**

[1] สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยี สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

[2] สาขาวิชาอาชีวอนามัยและความปลอดภัย สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

[3] สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

## บทคัดย่อ

น้ำส้มจาก (Nipa palm vinegar) เป็นผลิตภัณฑ์ชุมชนที่นำมาใช้เป็นอาหารและทางการแพทย์พื้นบ้านอย่างแพร่หลายในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มจาก โดยทดสอบการยับยั้ง 2,2-azinobis(3-ethylbenzo thiozoline)-6-sulfornic acids (ABTS) radical, nitric oxide, 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH) radical, hydroxyl radical, lipid peroxidation และทดสอบการเกิด metal ion chelation ผลการศึกษาพบว่าการยับยั้ง ABTS radical และ DPPH radical สัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของน้ำส้มจาก ($r$ = 0.973 และ 0.407 ตามลำดับ) การยับยั้ง hydroxyl radical และ lipid peroxidation สูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของน้ำส้มจาก 12.5% (v/v) แล้วลดลงตามระดับความเข้มข้นของน้ำส้มจากที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามน้ำส้มจากไม่สามารถยับยั้ง nitric oxide และไม่สามารถเป็น metal chelator ได้ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มจากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระบางชนิดในหลอดทดลองได้ เป็นข้อมูลประโยชน์ต่อสุขภาพเบื้องต้นของน้ำส้มจาก การศึกษาชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มจากเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการส่งเสริมการบริโภคน้ำส้มจากต่อไป

**คำสำคัญ:** การต้านอนุมูลอิสระ ความเครียดออกซิเดชัน น้ำส้มจาก (Nipa palm vinegar)

*** ผู้รับผิดชอบบทความ**

ดร.อุดมรัตน์ วัฒนสิทธิ์

สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยี สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

E-mail: ohenhwu@gmail.com

# *In vitro* Antioxidant Activities of Nipa Palm Vinegar

**Udomratana Vattanasit[1*], Supabhorn Yimthiang[2] and Wiyada Kwanhian[3]**

[1] Department of Environmental Health and Technology, School of Public Health, Walailak University
[2] Department of Occupational Health and Safety, School of Public Health, Walailak University
[3] Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, Walailak University

## Abstract

Nipa palm vinegar (NPV) is a local product which is widely consumed in habitual diet and used in traditional medicine in Pak Phanang District, Nakhon Si Thammarat Province. This study aimed to investigate antioxidant activities of the NPV. Determination of antioxidant activities were assessed by inhibition of 2,2-azinobis(3-ethylbenzo thiozoline)-6-sulfornic acids (ABTS) radical, nitric oxide, 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH) radical, hydroxyl radical, and lipid peroxidation formation as well as metal ion chelating activity. The inhibition of ABTS and DPPH radicals were concentration-dependent ($r$ = 0.973 and 0.407, respectively). Besides, 12.5% (v/v) NPV caused the highest inhibition of hydroxyl radical and lipid peroxidation. However, the inhibitory effect was then declined when concentrations of NPV were increased. Inhibition of nitric oxide and metal chelating activity were not observed. NPV inhibits some types of free radicals which support health benefit of NPV. Further study to identify content of active compounds exerting antioxidant effects in NPV is interesting to generate a supportive data to promote NPV consumption.

**Key words:** Antioxidant activity, Oxidative stress, Nipa palm vinegar

*** Corresponding Author**

Dr.Udomratana Vattanasit

Department of Environmental Health and Technology, School of Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80161

E-mail: ohenhwu@gmail.com

**บทนำ**

ต้นจาก (*Nypa Fruticans* Wurmb) เป็นพืชตระกูลปาล์มชนิดหนึ่ง เจริญเติบโตได้ดีในระบบนิเวศลุ่มน้ำ ปากพนัง เนื่องจากมีสภาพเป็นดินเหนียว มีอินทรียวัตถุสูง มีน้ำท่วมขัง ต้นจากชอบแสงแดดจัด สามารถเจริญเติบโตได้เองในธรรมชาติทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย มักขึ้นเป็นดงในบริเวณป่าชายเลน สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ง่าย[1] ต้นจากจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีบทบาทสำคัญต่อวิถีการประกอบอาชีพของคนลุ่มน้ำปากพนัง ชาวบ้านตำบลขนาบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราชได้สะสมภูมิปัญญาในการประกอบอาชีพจากต้นจากมาอย่างยาวนานโดยพบว่าต้นจากสามารถใช้ประโยชน์ได้เกือบทุกส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำหวานจากสามารถนำไปหมักเพื่อผลิตเป็น “น้ำส้มจาก” หรือ Nipa palm vinegar (NPV) ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อเสียงของอำเภอปากพนัง และถูกนำมาใช้ในการปรุงอาหารให้มีรสเปรี้ยว เช่น ใส่ในแกงส้ม หรือต้มส้ม หรือใช้ในการทำยำต่าง ๆ โดยเติมลงในอาหารครั้งละประมาณ 3-5 mL หากผลิตได้มากก็มีการจำหน่ายให้แก่เพื่อนบ้านหรือเป็นของฝากจากปากพนัง นอกจากนั้นยังมีการใช้น้ำส้มหมักในทางการแพทย์พื้นบ้าน โดยชาวบ้านมีความเชื่อในสรรพคุณของน้ำส้มจากว่าสามารถลดอาการไอ แก้โรคความดัน และเบาหวาน อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยืนยันแน่ชัดเกี่ยวกับฤทธิ์ของน้ำส้มจากในประเทศไทย รายงานการวิจัยฉบับหนึ่งจากประเทศมาเลเซียซึ่งมีการปลูกต้นจากและนำน้ำส้มจากมาใช้ เพื่อเป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรคเบาหวาน แสดงให้เห็นว่ากรดแอซิติกในน้ำส้มจาก มีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวาน นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระจากสารประกอบกลุ่มฟีโนลิกส์[2]

สารอนุมูลอิสระ เป็นธาตุหรือสารประกอบซึ่งมีประจุรวมเป็นบวกหรือลบหรือเป็นศูนย์และมีอิเล็กตรอนเดี่ยวหรืออิเล็กตรอนที่ขาดคู่อยู่ในวงโคจร สารอนุมูลอิสระที่สำคัญที่มักเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่าง ๆ โดยมากมักเป็นกลุ่ม oxygen-containing free radicals เช่น hydroxyl radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide, oxygen singlet และ nitric oxide radical เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะมีความไวสูง ทำให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การเปลี่ยนสภาพโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต การสร้างพันธะโคเวเลนต์กับโปรตีนหรือเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้เพิ่มอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ รวมถึงโรคเบาหวานด้วย[3] สารประกอบกลุ่มฟีโนลิกส์ซึ่งพบในน้ำส้มจากสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง[2] และมีรายงานว่าสารกลุ่มนี้สามารถป้องกันการเกิดความเสียหายจากสารอนุมูลอิสระ (oxidative damage) โดยพบว่าสามารถลดระดับของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของการเกิด lipid peroxidation ในสัตว์ทดลองได้[4] จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นทำให้

ผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มจาก ซึ่งเป็นผลผลิตของพืชท้องถิ่นในชุมชนขนาบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่มีการนำมาใช้รักษาโรคจากภูมิปัญญาชาวบ้านโดยนำมาทำการทดลองทางห้องปฏิบัติการ เพื่อนำผลการศึกษาที่ได้ไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนคุณประโยชน์ของน้ำส้มจากในทางสุขภาพซึ่งอาจนำไปเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ชุมชน

## วิธีการศึกษา

### ตัวอย่างน้ำส้มจาก

เก็บตัวอย่างน้ำส้มจากที่ผลิตในชุมชนตำบลขนาบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช จากแหล่งผลิตหลัก 3 หมู่บ้าน หมู่บ้านละ 3 ตัวอย่าง จำนวนรวม 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำส้มถูกแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ส่วนละ 1.5 mLในการเก็บรักษาเพื่อนำไปใช้สำหรับแต่ละการทดลอง โดยเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20$^{o}$C ก่อนทำการวิเคราะห์นำตัวอย่างมาตั้งในตู้เย็นอุณหภูมิ 4$^{o}$C จนตัวอย่างละลาย แต่ละการทดสอบใช้ตัวอย่างน้ำส้มจากที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100% (v/v) โดยเจือจางน้ำส้มจากในน้ำกลั่น แต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

### การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

### อุปกรณ์และสารเคมี

การวัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง UV/Vis microplate spectrophotometer รุ่น Multiskan GO (Thermo Scientific) สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ 2,2-azinobis(3-ethylbenzo thiozoline)-6-sulfornic acids (ABTS) และ ascorbic acid เป็นผลิตภัณฑ์ชนิด ultrapure grade และanalytical grade ตามลำดับ ของบริษัท Bio Basic Inc. (Canada) ethanol และ 30% hydrogen peroxide เป็นผลิตภัณฑ์ชนิด analytical grade ของบริษัท Merck (Germany) phosphate buffered saline (PBS) และ acetic acid เป็นผลิตภัณฑ์ชนิด analytical grade ของบริษัท Amresco (USA) และ QRëC (New Zealand) ตามลำดับ สารเคมีอื่นๆ เป็นผลิตภัณฑ์ชนิด analytical grade ของบริษัท Sigma-Aldrich (USA)

### ABTS radical scavenging activity

การประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างใช้วิธีการทดสอบของ Re และคณะ[5] โดยมีหลักการคือการวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงของ ABTS radical cation เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบทำได้โดยการนำสารละลาย ABTS 7 mM และ สารละลาย potassium persulfate 2.45 mM มาทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเจือจางด้วย ethanol (1:89 v/v) ที่อุณหภูมิ 30$^{o}$C จากนั้นปิเปตต์สารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้วดังกล่าวมา 180 µL ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำส้มจากที่เจือจางด้วย ethanol 20 µL ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100% (v/v) หรือสารมาตรฐาน Trolox 6 ความเข้มข้น (3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50 และ 125.0 µg/mL) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 734 nm

ที่อุณหภูมิ 30 °C ทำการทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง แสดงฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยค่า $IC_{50}$ ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% รายงานผลด้วยค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ซึ่งคำนวณจากค่า $IC_{50}$ ของสารมาตรฐาน Trolox หารด้วยค่า $IC_{50}$ ของตัวอย่างน้ำส้มจาก และแสดงค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (% inhibition) โดยคำนวณจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำส้มจาก

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times (A_0 - A_s)/A_0$$

เมื่อ $A_0$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม และ $A_s$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

**Nitric oxide scavenging assay**

การทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Garratt และคณะ[6] ทำโดยเตรียมสารละลาย sodium nitroprusside (SNP) ความเข้มข้น 100 mM ในสารละลาย PBS ทำการทดลองโดยปิเปตต์สารละลาย SNP 100 mM ดังกล่าว ปริมาตร 200 µL และสารละลาย PBS 1,800 µL ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 180 นาที เพื่อสังเคราะห์ nitric oxide เมื่อครบเวลาเติมตัวอย่างน้ำส้ม จากความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100% (v/v) หรือ gallic acid (positive control) ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 1 mL ลงไป จากนั้นเติม Griess reagent ซึ่งเตรียมจาก 1% sulfanilamide และ 0.1% naphthyletylenediamine dihydrochloride (NED) ใน 2% phosphoric acid ($H_3PO_4$) ลงในหลอดทดลองในอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 540 nm ทำการทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง หลอดที่น้ำส้มจากแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากจะแสดงค่า nitric oxide ในหลอดทดลองน้อยกว่าเมื่อเทียบกับหลอดที่ไม่มีน้ำส้มจาก แสดง ผลค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (% inhibition) โดยคำนวณจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มจาก เทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำส้มจาก

**Free radical scavenging activity (DPPH Method)**

การทดสอบนี้ใช้วิธี DPPH โดย Brand-Williams และคณะ[7] เตรียมสารละลาย 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 100 mM ใน methanol แล้วปิเปตต์ลงใน 96 well plate หลุมละ 200 µL แล้วจึงเติมตัวอย่างน้ำส้มจากความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100% (v/v) ที่เตรียมไว้หรือสารมาตรฐาน Trolox 6 ความเข้มข้น (3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50 และ 125.0 µg/mL) ปริมาตร 50 µL แล้วจึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 515 nm ทำการทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง โดยแสดงฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยค่า $IC_{50}$ ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% รายงานผลด้วยค่า TEAC ซึ่งคำนวณจากค่า $IC_{50}$ ของสารมาตรฐาน Trolox หารด้วยค่า $IC_{50}$ ของตัวอย่าง

น้ำส้มจาก และแสดงค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (% inhibition) โดยคำนวณจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำส้มจาก

**Hydroxyl radical scavenging assay**

การทดสอบอาศัยการสังเคราะห์สารอนุมูลอิสระชนิด hydroxyl radical ด้วยสาร deoxyribose, ferric chloride, ascorbic acid และ hydrogen peroxide ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่อาจมีอยู่ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ การทดสอบดัดแปลงจากวิธีของ Halliwell และคณะ[8] ทำโดยปิเปตต์สารละลาย deoxyribose 28 mM ในสารละลาย potassium dihydrogen-phosphate 20 mM ปริมาตร 100 µL, 200 µM ferric chloride ปริมาตร 100 µL และ 10 mM hydrogen peroxide ปริมาตร 100 µL ลงในหลอดทดลองแล้วปิเปตต์ตัวอย่างน้ำส้มจากความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100% (v/v) ที่เตรียมไว้ หรือสาร quercetin (positive control) ความเข้มข้น 300 µM ปริมาตร 500 µL ลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 1% thiobarbituric acid (TBA) และ 2.8% trichloro-acetic acid (TCA) อย่างละ 1 mL ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C นาน 20 นาที จะได้สารสีชมพู เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 532 nm ทำการทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง แสดงผลค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (% inhibition) โดยคำนวณจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำส้มจาก

**Metal ion chelating activity**

การวิเคราะห์ metal ion chelating activity ของน้ำส้มจาก ดัดแปลงจากวิธีการของ Dinis และคณะ[9] ทำได้โดยเติมตัวอย่างน้ำส้มจากความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100% (v/v) หรือสารมาตรฐาน ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 4 ความเข้มข้น (31.25, 62.50, 125.0 และ 250.0 µg/mL) ปริมาตร 800 µL ลงในสารละลาย 2 mM ferrous chloride 100 µL ปฏิกิริยาเริ่มโดยการเติม 5 mM ferrozine ปริมาตร 400 µL หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 562 nm ทำการทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank แสดงผลค่าการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (% inhibition) โดยคำนวณจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำส้มจาก

**Inhibition of lipid peroxidation**

การวิเคราะห์นี้ดัดแปลงจากวิธี thio-barbituric acid-reactive species (TBARS) assay[10] เพื่อวัดการเกิด lipid peroxide ที่เกิดขึ้นโดยใช้ egg-york homogenates เป็น lipid-rich media หลักการวิเคราะห์คือ malondialdehyde ซึ่งเป็น secondary product ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ polyunsaturated fatty acid ทำปฏิกิริยากับสอง

โมเลกุลของ TBA ทำให้เกิด chromogen สีแดงชมพู ซึ่งวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 532 nm การวิเคราะห์นี้ทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำส้มจากความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100% (v/v) ปริมาตร 2.5 µL และ egg-york homogenates 125 µL (10% โดยปริมาตรในน้ำกลั่น) ผสมกันในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติม 0.07 M ferrous sulfate heptahydrate ปริมาตร 12.5 µL ลงในหลอดทดลองและบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิด lipid peroxidation หลังจากนั้น เติม 20% acetic acid 187.5 µL (ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วย sodium hydroxide), 0.8% TBA (w/v เตรียมในสารละลาย 1.1% sodium dodecyl sulphate) 375 µL และ 20% TCA 125 µL แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นลงโดยแช่ในน้ำแข็ง ก่อนเติม 1-butanol 625 µL ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำส่วนใสด้านบน (organic solvent) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 532 nm ทำการทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง แสดงผลค่าการยับยั้ง lipid peroxidation (% inhibition) โดยคำนวณจากการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำส้มจาก

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

ผลจากทุกการทดลองของน้ำส้มจากที่ได้ทำการทดลอง 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างละสามซ้ำ แสดงผลในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของน้ำส้มจาก 4 ระดับความเข้มข้นโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Post-Hoc LSD Test และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ Pearson's Correlation Coefficient กำหนดค่าของระดับความเชื่อมั่นไว้เท่ากับ 95%

**ผลการศึกษา**

**ABTS radical scavenging activity assay**

ตัวอย่างน้ำส้มจากที่นำมาทดสอบยับยั้ง ABTS Radical ได้มากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยร้อยละการยับยั้ง ABTS Radical และความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำส้มจากมีความสัมพันธ์กัน อย่างมีนัยสำคัญ ($r = 0.973$, $p < 0.001$) นอกจากนี้น้ำส้มจากแต่ละความเข้มข้นสามารถยับยั้ง ABTS Radical ที่แตกต่างจาก Control และแตกต่างจากระดับความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อคำนวณค่า $IC_{50}$ และ ค่า TEAC ของตัวอย่างน้ำส้มจากที่ทดสอบพบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 428.97 ± 48.89 µL/mL และ 0.10 ± 0.01 mg/mL ตามลำดับ

**Nitric oxide scavenging assay**

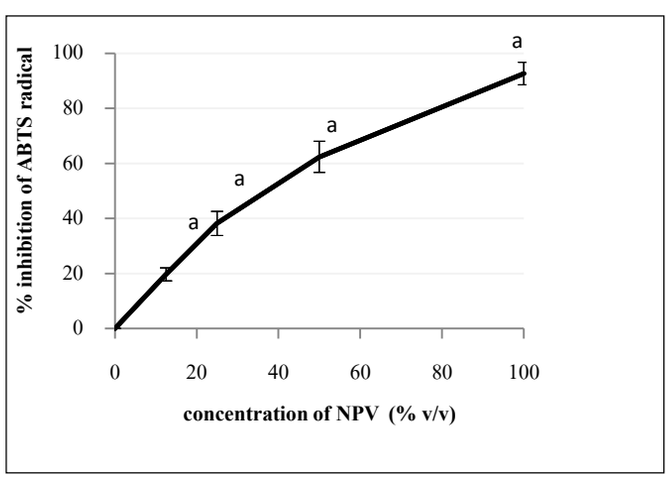
ตัวอย่างน้ำส้มจากทุกระดับความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้ง Nitric Oxide ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Control และระดับของการยับยั้งไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ในขณะที่ 2 mM gallic acid ซึ่งใช้เป็น positive control สามารถยับยั้งการเกิด nitric oxide ได้ 51%

**DPPH radical scavenging assay**

ตัวอย่างน้ำส้มจากที่ระดับความเข้มข้น 12.5% และ 25-100% ยับยั้ง DPPH radical ได้แตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และ 0.001 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2 โดยร้อยละการยับยั้ง DPPH radical และความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำส้มจากมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ($r = 0.407$) ทั้งนี้น้ำส้มจาก 100% ที่นำมาทดสอบยับยั้ง DPPH radical ได้เฉลี่ยเพียง 8.75%

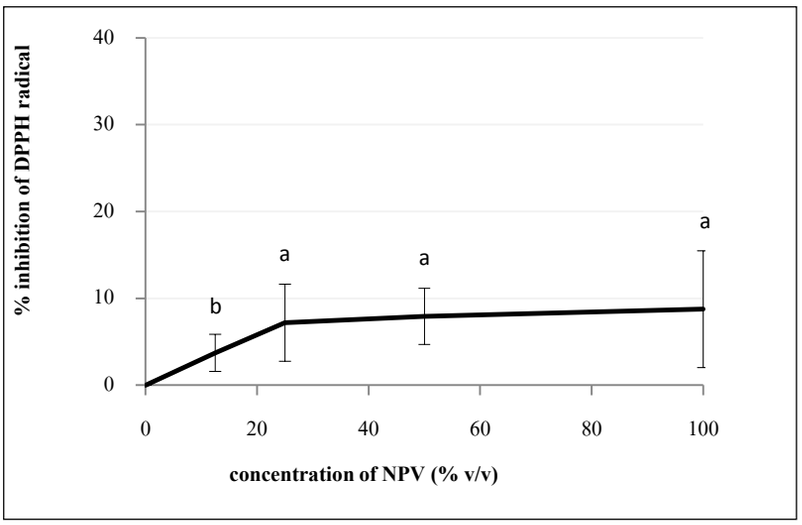
**Hydroxyl radical scavenging assay**

ตัวอย่างน้ำส้มจากทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้ง hydroxyl radical แตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) นอกจากนี้น้ำส้มจากทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นก็ให้ค่าการยับยั้ง hydroxyl radical ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$: ANOVA) เช่นกัน โดยระดับของการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 25% ต่างกับ 50% และระดับความเข้มข้นที่ 50% ต่างกับ 100% ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ และ 0.001 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลการศึกษา พบแนวโน้มของการยับยั้งลดลงตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3.



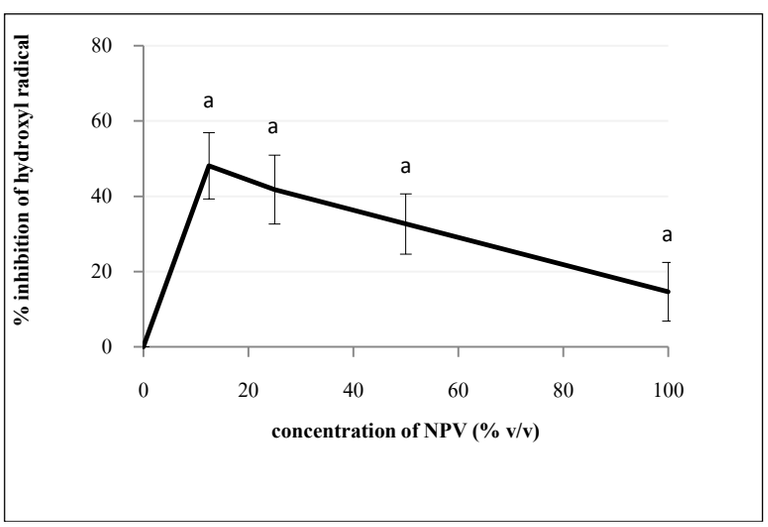

**รูปที่ 1.** การเพิ่มขึ้นของร้อยละการยับยั้ง ABTS radical ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำส้มจาก

(โดย [a] แสดงความแตกต่างของการยับยั้ง ABTS radical ของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ $p < 0.001$)




**รูปที่ 2** การเพิ่มขึ้นของร้อยละการยับยั้ง DPPH radical ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำส้มจาก

(โดย [a] และ [b] แสดงความแตกต่างของการยับยั้ง DPPH radical ของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ $p < 0.001$ และ 0.05 ตามลำดับ)




**ภาพที่ 3** แนวโน้มการยับยั้ง Hydroxyl radical ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำส้มจาก

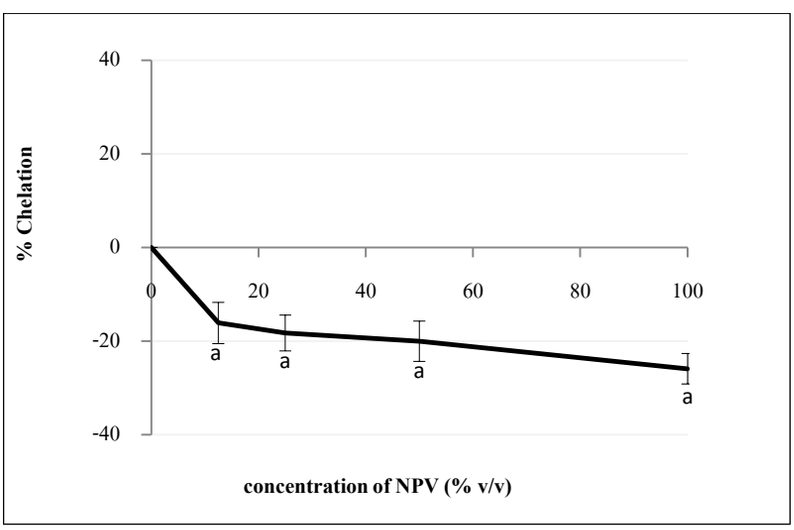
(โดย [a] แสดงความแตกต่างของการยับยั้ง Hdroxyl radical ของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ $p < 0.001$)

**Metal ion chelating activity**

ตัวอย่างน้ำส้มจากไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา chelation กับ ferrous ได้ จากการทดสอบพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มจากมากกว่าหลอดควบคุมในทุกระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ จึงทำให้ได้ร้อยละการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระโดยการเกิด chelation มีค่าเป็นลบ ดังแสดงในรูปที่ 4ก จากการทดสอบสารมาตรฐาน EDTA ที่ระดับความเข้มข้น 31.3 – 250 µg/mL เพื่อการคำนวณ EDTA Equivalent พบว่าสามารถเกิด chelation ได้เพิ่มตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในช่วง 10.06 – 82.56% ดังแสดงในรูปที่ 4ข

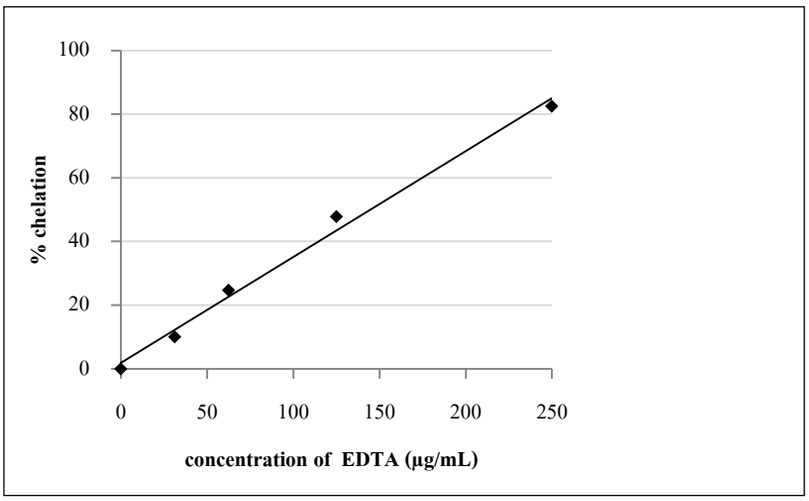
**Inhibition of lipid peroxidation**

ตัวอย่างน้ำส้มจากทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้แตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) นอกจากนี้น้ำส้มจากทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นก็ให้ค่าการยับยั้ง lipid peroxidation ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เช่นกัน โดยระดับของการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นที่ 12.5% ต่างกับที่ 50% และ 100% ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ และ 0.001 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าแนวโน้มของการยับยั้งลดลงตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5

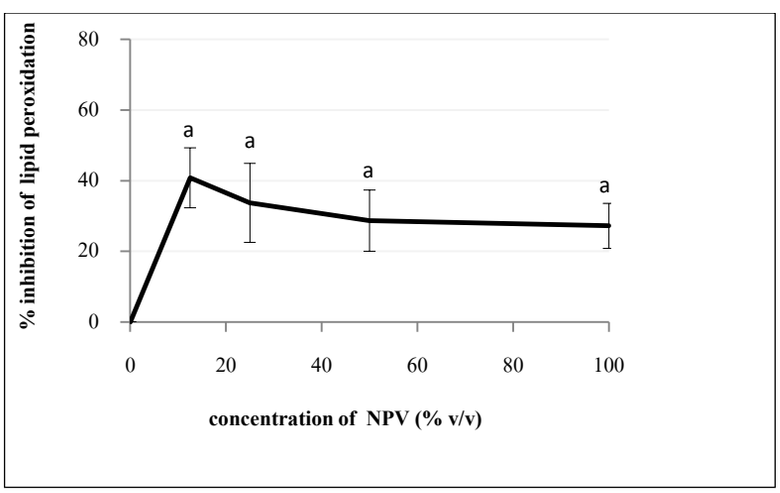



**รูปที่ 4ก** การลดลงของร้อยละการเกิด metal ion chelation ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำส้มจาก

(โดย [a] แสดงความแตกต่างของการเกิด metal ion chelation ของตัวอย่างน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ $p < 0.001$)




**รูปที่ 4ข** การเพิ่มขึ้นของร้อยละการเกิด metal ion chelation ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ EDTA




**รูปที่ 5** แนวโน้มการยับยั้ง lipid peroxidation ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำส้มจาก

(โดย[a] แสดงความแตกต่างของการยับยั้ง lipid peroxidation ของน้ำส้มจากเทียบกับหลอดควบคุมที่ $p < 0.001$)

**วิจารณ์ผลการศึกษา**

ร่างกายของมนุษย์มีสารอนุมูลอิสระเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อและสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกายได้ แม้ว่ากลไกภายในร่างกายมีระบบต้านอนุมูลอิสระต่างๆ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase หรือสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหารชนิดต่างๆ เช่น ascorbic acid, α-tocopheral และ β-carotene[11] อย่างไรก็ตามการเกิดสารอนุมูลอิสระที่มากเกินประสิทธิภาพการทำงานของกลไกร่างกายที่จะสามารถจัดการได้ ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่ง ของการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้นการได้รับสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ เป็นส่วนหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการเกิดโรค ที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ได้ ไม่ว่าจะเป็นการได้รับจากอาหารเสริมต่าง ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์หรือสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และจากการบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่โดยธรรมชาติซึ่งกำลังได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ในปัจจุบัน

น้ำส้มจากมีการบริโภคภายในครัวเรือนและจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์ในท้องถิ่น ชุมชนขนาบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราชมาเป็นเวลานาน การแปรรูปน้ำหวานจากไปเป็นผลิตภัณฑ์น้ำส้มจากนี้เป็นการถนอมอาหารประเภทหนึ่ง และส่วนหนึ่งมาจากความเชื่อที่ว่าน้ำส้มจากสามารถรักษาอาการของโรคต่าง ๆ เช่น โรคความดัน และโรคเบาหวานได้ตามความเชื่อในทางการแพทย์พื้นบ้าน นอกจากนี้จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารสกัดน้ำส้มจากที่ผลิตในประเทศมาเลเซียมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระซึ่งสัมพันธ์กับสารประกอบกลุ่มฟีโนลิกส์ (phenolic compounds) ที่มีอยู่ในน้ำส้มจาก[2] ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มจากที่ผลิตในตำบลขนาบนากสามารถยับยั้งการเกิด ABTS radical ได้ โดยร้อยละการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่มากขึ้น ระดับการยับยั้งของน้ำส้มจาก 100% มีค่าสูงสุดโดยยับยั้งได้ 92.68% ค่า TEAC ของตัวอย่างน้ำส้มจากที่ทำการทดสอบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.10 ± 0.01 mg/mL ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบการยับยั้ง DPPH radical พบว่ายับยั้งได้เช่นกันแต่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของร้อยละการยับยั้งน้อยกว่า ABTS radical ความแตกต่างระหว่างการยับยั้ง ABTS และ DPPH radicals อาจเนื่องมาจากการทดสอบการยับยั้ง ABTS radical เหมาะกับการทดสอบสารในสภาวะกรด[7] และสารกลุ่ม phenolic compounds มากกว่า[12] และเมื่อทำการทดสอบตัวอย่างน้ำส้มจากด้วย nitric oxide scavenging assay พบว่าน้ำส้มจากในทุกระดับความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้ง nitric oxide ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาข้างต้นกับผลการศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของน้ำส้มจากในประเทศมาเลเซียซึ่งมีการทดสอบการยับยั้ง ABTS และ DPPH radicals เช่นกัน พบว่า น้ำส้มจากสามารถยับยั้ง ABTS และ DPPH radicals ได้มาก

ขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องการศึกษาน้ำส้มจากในประเทศมาเลเซียซึ่งใช้ช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่าการศึกษานี้ คือ 0.25-4.0 mg/mL และ 0.8-25 mg/mL ตามลำดับ และการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของน้ำส้มจากและสารสกัดจากน้ำส้มจาก (สารสกัด ethyl acetate และสารสกัดน้ำ) ในการยับยั้ง ABTS radical พบว่าสารสกัด ethyl acetate ซึ่งมีปริมาณของสารประกอบกลุ่ม phenolic และ flavonoid สูงสุดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือน้ำส้มจากที่ไม่ได้สกัด และสารสกัดน้ำ (aqueous extract) โดยมีค่าเฉลี่ย $IC_{50}$ เท่ากับ 2.77, 7.78 และ 17.12 mg/mL ตามลำดับ[2] ในขณะที่น้ำส้มจากในการศึกษานี้ซึ่งไม่ได้ผ่านการสกัด มีค่าเฉลี่ย $IC_{50}$ เท่ากับ 428.97 µL/mL อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการยับยั้ง DPPH radical ของตัวอย่างน้ำส้มจากในการศึกษานี้พบค่าเฉลี่ยการยับยั้ง DPPH radical สูงสุดเพียง 8.75% ในขณะที่การศึกษาน้ำส้มจากในประเทศมาเลเซียพบว่าตัวอย่างน้ำส้มจากที่ไม่ผ่านการสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้คือ 25 mg/mL สามารถยับยั้ง DPPH radical ได้ถึง 70 – 80%

ในการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ นั้นสามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตาม mode of action ได้แก่ hydrogen atom transfer (HAT) based assay ที่ใช้วัดความสามารถของ antioxidant ในการทำลายอนุมูลอิสระ ซึ่งมักหมายถึง peroxyl radicals เช่น ABTS radical scavenging assay และอีกกลุ่มหนึ่งคือ single electron transfer (SET) based assay ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับสารที่มีสีซึ่งเป็น oxidizing agent ความสามารถในการเกิด reduction ของ oxidant สามารถสังเกตได้จากสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง เช่น DPPH free radical scavenging assay เป็นต้น[13] ความแตกต่างของผลการทดสอบด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay และ DPPH free radical scavenging assay อาจเป็นผลจากความแตกต่างของกลไกการต้านอนุมูลอิสระข้างต้น และองค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำส้มจาก ในแต่ละพื้นที่ก็อาจแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของความแตกต่างของผลการศึกษาที่พบในการศึกษานี้และในประเทศมาเลเซีย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาองค์ประกอบในน้ำส้มจากเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถเชื่อมโยงกันได้มากขึ้น ในส่วนของผลทดสอบการยับยั้ง nitric oxide ของตัวอย่างน้ำส้มจาก แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มจากไม่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระชนิดนี้ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้ง nitric oxide ของน้ำส้มจากในการศึกษาอื่น ๆ ทั้งนี้ nitric oxide เป็นสารอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง ที่ทำหน้าที่ยับยั้ง chain reactions ในการเกิด lipid peroxidation ได้โดยการกำจัด lipid peroxyl radicals ในทางกลับกันหากมี superoxide อยู่ด้วย จะทำให้เกิด peroxynitrite ซึ่งทำให้เกิด lipid peroxidation ได้เช่นกัน[14] นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอทั้งจาก nitrosative deamination of DNA bases และ ปฏิกิริยา oxidation ของ bases และน้ำตาล ในโมเลกุลดีเอ็นเอ[15]

Hydroxyl radicals เป็นสารอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีส่วนสำคัญในการเกิด peroxidation ของ lipid และ สารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ในร่างกาย และเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในร่างกาย[16] ในการทดสอบการยับยั้ง hydroxyl radicals ของตัวอย่างน้ำส้มจาก hydroxyl radicals ที่ถูกทำให้เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะไปทำลาย deoxyribose ออกเป็นชิ้นเล็กๆ (fragment) เกิดเป็น malondialdehyde (MDA) ซึ่งมีสีชมพูเมื่อให้ความร้อนในสารละลาย TBA ผลการศึกษาพบว่าการเติมน้ำส้มจากลงไปในปฏิกิริยาทำให้ความเข้มของสีลดลงเมื่อเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่ได้เติมน้ำส้มจาก แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มจากมีฤทธิ์ในการยับยั้ง hydroxyl radicals อย่างไรก็ตามร้อยละการยับยั้ง hydroxyl radicals ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของน้ำส้มจาก 25% ขึ้นไป ซึ่งพบว่ารูปแบบของการยับยั้ง hydroxyl radicals นี้คล้ายคลึงกับผลการทดสอบการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของตัวอย่างน้ำส้มจาก การลดลงของร้อยละการยับยั้ง hydroxyl radicals ที่ความเข้มข้นสูง ๆ อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของระดับความเข้มข้นของกรด acetic acid ซึ่งแม้ว่าน้ำส้มจากในความเข้มข้นสูงจะมีสารสำคัญมากขึ้นที่ช่วยลดระดับของ hydroxyl radicals แต่ความเข้มข้นของ acetic acid ที่เพิ่มขึ้นตามไปด้วยอาจมีผลต่อการลดลงระดับการยับยั้ง hydroxyl radicals อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ยืนยันความเกี่ยวข้องนี้ และการบริโภคน้ำส้มจากโดยทั่วไปนิยมเติมลงในอาหารชนิดต่าง ๆ ไม่ได้มีการบริโภคโดยตรง ดังนั้นผลของ acetic acid ที่ความเข้มข้นสูงจึงไม่น่าจะมีผลต่อ hydroxyl radical scavenging activity ของน้ำส้มจาก

สารบางชนิด อาจเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันได้โดยกลไกการจับกับโลหะทรานซิชัน หรือเรียกว่าการเกิดคีเลชัน (chelation) เนื่องจากโลหะดังกล่าว เช่นเหล็ก ($Fe^{2+}$) ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระโดยปฏิกิริยาที่เรียกว่า Fenton reaction ดังนั้นเมื่อทำให้โลหะเหล่านั้นถูกจับไว้จึงไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวและลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าสารในน้ำส้มจากไม่สามารถทำให้เกิด chelation กับโลหะได้ ในขณะที่การใช้สารมาตรฐาน EDTA ที่ระดับความเข้มข้น 31.3 – 250 μg/mL พบว่าสามารถเกิด chelation ได้เพิ่มตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในช่วง 10.06 – 82.56% ซึ่งบ่งบอกว่าวิธีการทดสอบนี้ใช้ประเมินความสามารถในการจับโลหะได้ ทั้งนี้การที่การทดลองกับตัวอย่างน้ำส้มจากเกิด chelation ได้น้อยกว่า control ซึ่งอาจเนื่องมาจากค่า pH ที่ลดลงอันเนื่องมาจากกรดแอซีติกในน้ำส้มจาก ทั้งนี้ pH เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเกิดและความเสถียรของคีเลตที่เกิดขึ้น โดย chelating agent ส่วนใหญ่จะไม่เสถียรที่ pH ต่ำ[17]

**สรุปผลการศึกษา**

ตัวอย่างน้ำส้มจากที่ผลิตในชุมชนตำบลขนาบนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช สามารถยับยั้งการเกิด ABTS radical (TEAC เท่ากับ 0.10 ± 0.01 mg/mL) และ DPPH radical ได้โดยค่าเฉลี่ยการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้น

และสามารถยับยั้ง hydroxyl radical และ lipid peroxidation ได้สูงสุด (48.09 และ 40.83% ตามลำดับ) ที่ความเข้มข้นน้ำส้มจาก 12.5% และค่าการยับยั้งลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ในขณะที่ไม่สามารถยับยั้งการเกิด nitric oxide และไม่สามารถเป็น metal chelator ได้ ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระบางชนิดได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาชนิดของสารสำคัญในน้ำส้มจากเพื่อเป็นหลักฐานทางวิชาการที่ชัดเจนมากขึ้นในการส่งเสริมการบริโภคเป็นอาหารที่มีคุณประโยชน์ในการดูแลสุขภาพซึ่งหาได้ง่ายในท้องถิ่น ราคาไม่แพง และเพิ่มมูลค่าของน้ำส้มจากซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ชุมชนของจังหวัดนครศรีธรรมราชต่อไป

**กิตติกรรมประกาศ**

ผลงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนโครงการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

**เอกสารอ้างอิง**

1. สุรินทร์ สุวรรณรัตน์. จาก พืชมหัศจรรย์ที่บ้านขนาบนาก. พิมพ์ครั้งที่ 1, 2559: 1
2. Yusoff NA, Yam MF, Beh HK, et al. Antidiabetic and antioxidant activities of Nypa fruticans Wurmb. vinegar sample from Malaysia. *Asian Pac J Trop Dis* 2015; 8(8): 595-605.
3. Das SK. Free radicals, antioxidants and nutraceuticals in health, disease & radiation biology. Preface. *Indian J Biochem Biophys* 2012; 49(5): 291-2.
4. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, *et al*. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 827(1):76-82.
5. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al*. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10): 1231-7.
6. Garratt DC. The quantitative analysis of drugs. Japan: Chapman and Hall ltd, 1964:pp 456-8.
7. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 1995; 28(1): 25-30.
8. Halliwell B, Gutteridge JMC, Arouma OI. The deoxyribose method: a simple test tube assay for the determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165: 215–9.

9. Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315(1): 161-9.
10. Ohkowa H, Ohisi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–8.
11. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1): 9-19.
12. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compost Anal* 2011; 24(7): 1043-8.
13. Frankel EN, Finley JW. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J Agric Food Chem* 2008; 56(13): 4901-8.
14. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics* 1999; 1411(2): 378-84.
15. Burney S, Caulfield JL, Niles JC, *et al.* The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 1999; 424(1-2): 37-49.
16. Gutteridge JM. Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1984; 172(2): 245-9.
17. Flora SJS, Pachauri V. Chelation in Metal Intoxication. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7(7): 2745-88.