รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การพัฒนาเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย

# Development of New Amperometric Method for Characterization and Evaluation of Antioxidant Properties in Thai Herbs


| คณะผู้วิจัย | สังกัด | |
|---|---|---|
| 1. ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย | คณะวิทยาศาสตร์ | มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 2. นางสาวเสาวนีย์ เหล่าสิงห์ | คณะวิทยาศาสตร์ | มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 3. นางสาวยุวากร เสนศรี | คณะวิทยาศาสตร์ | มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| 4. ผศ.ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา | คณะวิทยาศาสตร์ | มหาวิทยาลัยมหิดล (ที่ปรึกษา) |



โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ

ประจำปีงบประมาณ 2552

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

# กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงบประมาณแผ่นดินที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2552 ทำให้ได้มีโอกาสได้สร้างงานวิจัยชิ้นนี้ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. ดวงใจ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดต่าง ๆ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย และนักศึกษาทุกท่านที่ได้ช่วยเสนอความคิด และได้ทำงานวิจัยอย่างเต็มที่ ทำให้งานวิจัยและการนำเสนอผลงานในระดับต่าง ๆ ประสบความสำเร็จด้วยดี

## 1. บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ชื่อโครงการวิจัย

**การพัฒนาเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย**

**Development of new amperometric method for characterization and evaluation of antioxidant properties in Thai herbs.**

ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ **2552** จำนวนเงิน **358,800** บาท ระยะเวลาการดำเนินงาน **1** ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน/ปี) **ตุลาคม 2551** ถึง (เดือน/ปี) **กันยายน 2552**

รายนามหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมดำเนินการวิจัย

**1) ดร. มะลิวรรณ อมตธงไชย 2) น.ส. เสาวนีย์ เหล่าสิงห์ 3) น.ส. ยุวากร เสนศรี**

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย **ผศ.ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา**

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์แบบใหม่ เพื่อใช้ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) งานวิจัยแบ่งออกเป็นสองส่วนด้วยกันคือ ส่วนแรกคือระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่มีการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีด้วยขั้วไฟฟ้าชนิดใหม่ชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (Flow injection analysis with amperometric detection on GC/CNT electrode) โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ได้พัฒนาขึ้นในการติดตามปริมาณของสารอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) ก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับปริมาณการลดลงของสารอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และได้ประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ในพืชสมุนไพรไทย พบว่าให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ระบบที่พัฒนาขึ้นยังสามารถนำไปประยุกต์ได้กับงานวิเคราะห์อื่นๆ อีกด้วย

## 2. วัตถุประสงค์

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ และอุปกรณ์ทางเคมีวิเคราะห์ ควบคู่ไปกับพัฒนาเทคนิคในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ วัตถุประสงค์ย่อยของการวิจัยสามารถแบ่งเป็นข้อๆ ได้ดังนี้

2.1 พัฒนาเทคนิคและวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่ง่ายและสะดวก เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ของไทยในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะเป็นเทคนิควิเคราะห์แบบอัตโนมัติในระบบที่มีการไหลที่มีตัวตรวจวัดแบบเคมีไฟฟ้า (Flow injection technique with electrochemical detection) ซึ่งจะอาศัยการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity)

2.2 ศึกษาและวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการบ่งชี้ว่าสมุนไพรไทย โดยเฉพาะชนิดที่มีในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีองค์ประกอบหลักที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีคุณสมบัติทางยา เช่นสารประเภท polyphenols, phenolic acid, flavan และ flavonols ชนิดใด และพืชผักชนิดใดบ้างที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ปรุงอาหารหรือนำไปบริโภคเพื่อเป็นอาหารสุขภาพ

2.3 ประเมินคุณลักษณะของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น โดยการเปรียบเทียบการนำไปใช้ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

### 3. วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้พัฒนาระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่มีการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีด้วยขั้วไฟฟ้าชนิดใหม่ชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (Flow injection Analysis with amperometric detection on GC/CNT electrode)

3.1 ศึกษาและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่เพื่อใช้หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

3.2 ออกแบบและศึกษาหาสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นสารอนุมูลอิสระ , pH ของสารละลาย เพื่อนำมาใช้ในระบบวิเคราะห์ที่จะพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการติดตามสัญญาณของสารอนุมูลอิสระ ก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

3.3 ศึกษาถึงตัวแปรที่มีผลต่อขั้นตอนการสกัด เพื่อหาขั้นตอนที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างพืชสมุนไพร ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3.4 วิเคราะห์หาคุณลักษณะทางเคมีวิเคราะห์ของเทคนิค การวิเคราะห์แบบใหม่ที่พัฒนาขึ้นและนำมาประยุกต์ใช้ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพร

3.5 วิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยใช้เทคนิคตรวจวัดที่เป็นวิธีมาตรฐาน

3.6 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางการวิเคราะห์ ค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ระหว่างระบบตรวจวัดแบบใหม่ที่พัฒนาขึ้นใหม่ กับเทคนิคที่เป็นวิธีมาตรฐาน

**Abstract**

This work presents a new approach for evaluation of Total Antioxidant Capacity (TAC) based on the amperometric detection of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) at a carbon nanotubes-modified glassy carbon (GC/CNT) electrode was carried out. Electrochemical oxidations of DPPH and antioxidants, for examples catechin, quercetin, gallic acid, trolox and caffeic acid, were studied at the GC/CNT electrode using cyclic voltammetry and amperometric techniques. The cyclic voltammograms (CVs) of these compounds were firstly investigated in 40% ethanol-water solution containing 0.03 M KCl in 0.03 M phosphate buffer, pH 7.4. Comparison experiments were performed with glassy carbon (GC) electrode. Both of the GC and GC/CNT electrodes offer well-defined oxidation waves for all tested antioxidants. However, the GC/CNT provides a better sensitivity than GC electrode (8-30 times). The results from amperometry indicated that GC/CNT enable very sensitive and stable amperometric measurements of DPPH free radical. Capacities of the tested antioxidants were evaluated by amperometric detection of the residual concentration of non-reacted free radical. The results were used to construct a simple amperometric detector for evaluation of TAC as applied to flow injection analysis (GC/CNT-FI). Wide linear calibration curves were observed for all tested antioxidants. The detection limits at a low µM level were obtained. This method was successfully applied to evaluate antioxidant contents in 6 samples of Thai indigenous vegetable/herb extracts (*Careya sphaerica* Roxb., *Adenanthera pavonina* Linn., *Limnophila aromatica* Merr., *Syzygium gratum*(Wright) S.N., *Polygonum odoratum* Lour., *Cratoxylum formosum* Dyer.

The standard methods, including DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteau methods, were employed to evaluate TAC and phenolic contents in 11 indigenous vegetable/herb extracts. Results from ABTS method indicate that *Careya sphaerica* Roxb. has the highest TAC followed by *Syzygium gratum*(Wright) S.N., *Cratoxylum formosum* Dyer, *Polygonum odoratum* Lour., *Tiliacora triandra* Diels, *Limnophila aromatica* Merr., *Cratoxylum formosum* Dyer (flower), *Momordica charantia* L., *Melientha suavis* Pierre, *Tiger Herbal Centella asiatica* (Linn.) Urban, *Piper sarmentosum* Roxb, respectively. The order of TAC values from DPPH method was *Careya sphaerica* Roxb. > *Syzygium gratum* (Wright) S.N. > *Cratoxylum formosum* Dyer > *Polygonum odoratum* Lour.> *Limnophila aromatica* Merr. > *Cratoxylum formosum* Dyer (flower) > *Tiliacora triandra* Diels > *Momordica charantia* L. > *Tiger Herbal Centella asiatica* (Linn.) Urban ~ *Melientha suavis* Pierre ~ *Piper sarmentosum* Roxb, respectively. Total phenolic contents were also investigated in the samples by using Folin-Ciocalteau method. The results revealed that the order of total phenolic contents values form this method was *Careya sphaerica* Roxb. > *Cratoxylum formosum* Dyer > *Syzygium gratum* (Wright) S.N. > *Polygonum odoratum* Lour. > *Limnophila aromatica* Merr. > *Cratoxylum formosum* Dyer (flower) > *Tiliacora triandra* Diels > *Momordica charantia* L. > *Piper sarmentosum* Roxb ~ *Tiger Herbal Centella asiatica* (Linn.) Urban, *Melientha suavis* Pierre, respectively. The TAC values corresponded with the total phenolic contents.

Application of the proposed method for used as the detector in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was limited by the dilution with the mobile phase. Sensitivity of the developed method was lower than commercial photodiode array (PDA) detector. Therefore, the PDA detector was selected for evaluation and characterization of antioxidant contents in vegetable/herb extracts. The results from this study can be used as

nutrition data for selection to consume the vegetable and herbs extracts containing high levels of antioxidants in order to prevent or to improve the status of imbalance.

**Keywords:** Antioxidant, Carbon nanotube, Amperometry, DPPH, HPLC

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิควิเคราะห์แอมเปอร์โรเมทรีแบบใหม่เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity; TAC) โดยอาศัยการวัดปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ได้ศึกษาไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระที่สนใจเช่น catechin, quercetin, gallic acid และ caffeic acid ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40% โดยเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการใช้ขั้วไฟฟ้าแบบกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดาและที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) พบว่าไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากทั้งขั้วไฟฟ้า GC และ GC/CNT ให้พีคออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระที่สนใจที่ชัดเจน แต่ในขั้วไฟฟ้า GC/CNT มีสภาพไวที่สูงกว่าในขั้วไฟฟ้า GC ธรรมดา (ประมาณ 8-30 เท่า) ในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแบบแอมเพอร์โรเมทรีจะติดตามปริมาณของสารอนุมูลอิสระ (DPPH) ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ การวัดปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจึงวัดได้จากการลดลงของสัญญาณจาก DPPH ได้นำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสเพื่อใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAC) ผลการทดลองพบว่าเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นให้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงที่กว้างในสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบ โดยมีขีดจำกัดในการวิเคราะห์ในระดับที่ต่ำถึงไมโครโมลาร์ ในการประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรจำนวน 6 ชนิด (ผักกระโดน, ผักอีหลำ, ผักแขยง, ผักเม็ก, ผักแพ้ว และผักติ้ว) พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับเทคนิคมาตรฐานวิธี DPPH

ในการตรวจประเมินความสามารถสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ (Total phenolic content) ในสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรจำนวน 11 ชนิดในเขตจังหวัดอุบลราชธานี โดยใช้เทคนิคมาตรฐานวิธี DPPH, ABTS และ Folin-Cioculteau ผลการทดลองด้วยวิธี ABTS พบว่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของพืชสมุนไพรเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดน > ผักเม็ก > ผักติ้ว > ผักแพ้ว > ใบย่านาง > ผักแขยง > ดอกผักติ้ว > มะระขี้นก ~ ใบผักหวานป่า > บัวบก > ผักชะพลู ส่วนความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในผักและสมุนไพรจากวิธี DPPH เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก > ผักเม็ก > ผักติ้ว > ผักแพ้ว > ผักแขยง > ดอกผักติ้ว > ใบย่านาง > มะระขี้นก > บัวบก~ ใบผักหวานป่า~ ผักชะพลู ปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี Folin-Ciocalteau เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก > ผักติ้ว > ผักเม็ก > ผักแพ้ว > ผักแขยง > ดอกผักติ้ว> ใบย่านาง > มะระขี้นก ~ ผักชะพลู > บัวบก > ใบผักหวานป่า โดยผักและสมุนไพรที่พบว่ามีสารประกอบฟีโนลิกส์สูงมักมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมด้วย

ในการนำเทคนิคตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT มาใช้เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระหลังจากแยกด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากเกิดการเจือจางของสารต้านอนุมูลอิสระจากเฟสเคลื่อนที่ ทำให้สภาพไวที่ได้จากการวิเคราะห์ยังไม่ดีนักเมื่อเทียบกับตัวตรวจวัดชนิด photodiode array (PDA) ในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงเลือกใช้ตัวตรวจวัดชนิด PDA ผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบเบื้องต้นทางด้านโภชนาการสำหรับผู้บริโภคในการเลือกรับประทานผักสมุนไพรที่มีอยู่ในท้องถิ่นชนิดต่าง ๆ เพื่อรักษาสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ และได้รับคุณค่าทางโภชนาการสูงสุด

**คำหลัก: สารต้านอนุมูลอิสระ, คาร์บอนนาโนทิวบ์, แอมเพอร์โรเมทรี, ดีพีพีเอช,ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี**

# เทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม

## 1. บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบ ที่มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน การมีอนุมูลอิสระในร่างกายสามารถทำให้เซลล์หลายชนิดถูกทำลาย อาจส่งผลกระทบให้ระบบการทำงานของสารชีวโมเลกุลมีความผิดปกติไป หรือหากเป็นการทำลายโดยเปลี่ยนโครงสร้างของดีเอ็นเอ ทำให้ร่างกายมีการสร้างยีนที่ผิดปกติจนอาจกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระมาได้จากทั้งภายใน และภายนอกร่างกาย โดยภายในเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ (กระบวนการสร้างพลังงาน การเจริญเติบโตของเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการฆ่าเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว และระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์) ส่วนภายนอกอาจได้รับจากสิ่งแวดล้อมในหลายทางอาทิ การสัมผัสกับสารเคมี รังสี ยาบางชนิด มลพิษจากสิ่งแวดล้อม ควันบุหรี่ รวมไปถึงปริมาณแสงแดดที่เกินขนาด ปกติแล้วร่างกายของมนุษย์จะมีการรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมด้วยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) แต่ถ้าร่างกายเสียสมดุลโดยมีปริมาณของอนุมูลอิสระมากกว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอันเนื่องมาจากสาเหตุต่างๆ ดังที่กล่าวมาในข้างต้น ส่งผลให้เป็นที่มาของโรคต่างๆ เช่น การแก่ก่อนวัย โรคหัวใจ เบาหวาน โรคมะเร็ง ฯลฯ ดังนั้นมนุษย์จึงต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมจากภายนอกเช่น การรับประทานอาหารจำพวกผัก ผลไม้ และสมุนไพร ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยรักษาสมดุลระหว่างอนุมูลและสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเหตุนี้สารต้านอนุมูลอิสระจึงได้รับความสนใจจากนักวิจัย นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักโภชนาการ และผู้ที่รักสุขภาพเป็นอย่างมากในปัจจุบัน [1]

การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น Flavonoids, Carotenoids, Vitamin A, C, D, E, Gallic acid หรือสารประกอบฟีโนลิก [2] แต่ในความเป็นจริงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักสมุนไพรหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งรวมถึงสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าคือสารใด ดังนั้นการที่จะประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยาก และไม่จำเป็นประเด็นที่ควรสนใจตรวจวัดควรจะเป็นการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด การวัด TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า [3]

การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง หรือขจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือ สารที่นิยมใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้สารประกอบกลุ่มเอโซ เช่น 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) [4] ทำให้เกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เนื่องจากข้อดีของวิธีนี้คือสามารถทำการวิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงได้ ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ สารอีกตัวที่นิยมใช้เช่นกันคือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [5] การวิเคราะห์สามารถทำในทำนองเดียวกับการวิเคราะห์ $ABTS^{\bullet+}$ แต่เนื่องด้วยอนุมูล DPPH ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในร่างกายจริง ๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ส่งผลให้การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าความเป็นจริง [6]

สารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกส์ ได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, anthocyanins, carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid [7] สารในกลุ่มนี้เป็นสารที่ให้สีสันแก่พืช ผัก ผลไม้ เช่นสาร สาร carotenoids ที่ให้สีส้ม เหลือง ในแครอท ฟักทอง มะละกอ และ anthocyanins ที่ให้สีแดงในผลองุ่น สารเหล่านี้พบ

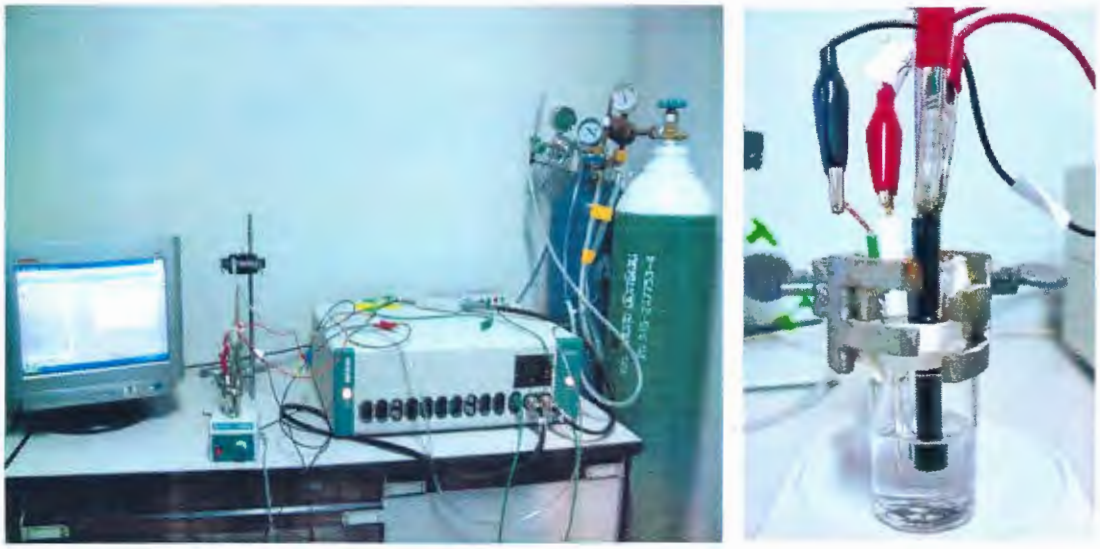
มากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สารต้านอนุมูลอิสระพวกนี้ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อต่าง ๆ และสามารถทนต่อปฏิกิริยา photooxidation ในการสร้างอาหารได้ [8] สารประกอบฟีโนลิกส์นอกจากจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด ลดการอักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง ต้านโรคภูมิแพ้ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย [9] วิธีในการประเมินหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์จะใช้ Folin-Ciocalteau Reagent (FCR) [10] ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่มีสีเหลือง และมีสารประกอบเชิงซ้อนของ heteropolyphosphotunstate-molybdates เป็นองค์ประกอบ เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารประกอบในกลุ่มฟีโนลิกส์ FCR จะถูกรีดิวซ์และโมลิบดีนัมจะถูกเปลี่ยนฟอร์มจากออกซิเดชั่น +6 เป็น +5 [ $Mo(VI) + e^- \rightarrow Mo(V)$ ] ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน ปริมาณของสารสารประกอบฟีโนลิกส์ในสารตัวอย่างจะแปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีน้ำเงิน (Mo(V)) ที่เกิดขึ้น ในด้านของความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา FCR ในวิธีการประเมินหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกส์นั้นจะใช้ $Na_2CO_3$ ความเข้มข้น 7.5% ในการปรับสภาพพีเอชให้อยู่ในสภาพเบส (pH~10) เพื่อทำให้สภาวะเหมาะสมกับการแตกตัวของสารประกอบโพลีฟีโนลิกส์เกิดเป็นฟีโนเลตไอออนและสามารถไปรีดิวซ์ FCR ได้ ดังนั้นปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินของโมลิบเดตที่เกิดขึ้นจึงแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ จากกระบวนการดังกล่าว ทำให้วิธีตรวจประเมินมีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ที่สูงขึ้น

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์แบบใหม่ เพื่อใช้ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) งานวิจัยแบ่งออกเป็นสองส่วนด้วยกัน ดังนี้ ส่วนแรกคือระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่มีการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีด้วยขั้วไฟฟ้าชนิดใหม่ ชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (Flow injection analysis with amperometric detection on GC/CNT electrode) โดยใช้ขั้วไฟฟ้าที่ได้พัฒนาขึ้นในการติดตามปริมาณของสารอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) ก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับปริมาณการลดลงของสารอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และส่วนที่สองคือได้ประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ในพืชสมุนไพรไทย, ผลไม้ไทย พบว่าให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ระบบที่พัฒนาขึ้นยังสามารถนำไปประยุกต์ได้กับงานวิเคราะห์อื่นๆ อีกด้วย

## 2. การทดลอง

### *2.1 Cyclic voltammetry*

การทดลองไซคลิกโวลแทมแสดงดังรูปที่ 1 โดยใช้เครื่อง potentiostat ของ Autolab รุ่น PG12 (Metrohm, Netherlands) เซลล์โวลแทมเมทรี (รูป 1b) ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา (3 mm diameter) หรือ ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ลวด Pt เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย

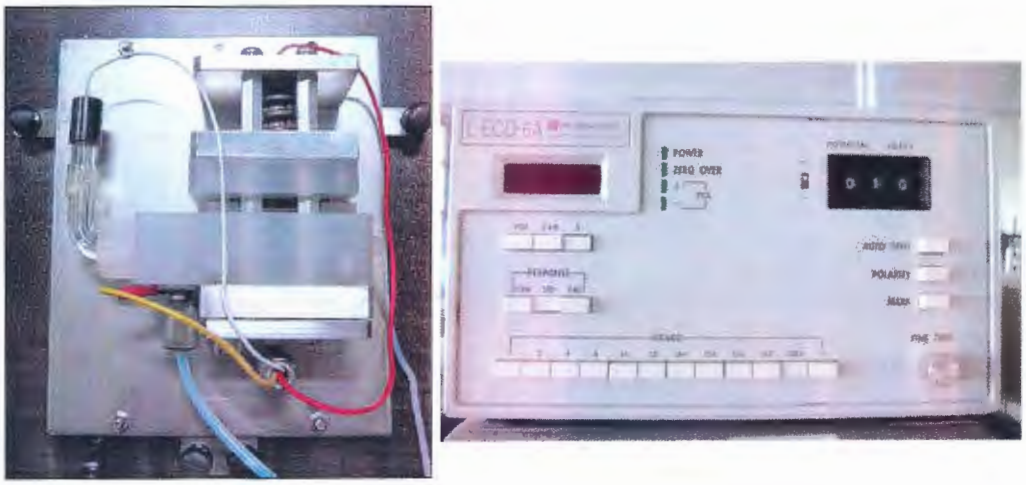


(a) (b)

**<u>รูปที่ 1</u>** การทดลองไซคลิกโวลแทมโมแกรม a) เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง b) โวลแทมเมทรีเซลล์

### *2.2 Amperometry*

การตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ใช้กับเทคนิคโฟลอินเจคชันอะนาลิซิส (รูปที่ 2) ใช้เครื่องตรวจวัดทางไฟฟ้าเคมีรุ่น L-ECD-6A (Shimadzu, Japan) ที่มี thin layer flow cell (รูป 2a) ประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา หรือ ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้า Ag/AgCl เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงและ ใช้ stainless steel เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย




(a) (b)

**<u>รูปที่ 2</u>** ตัวตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรี a) thin layer flow cell และ b) electrochemical detector (ECD) รุ่น L-ECD-6A บริษัท Shimadzu

### *2.3 การเตรียมตัวอย่าง*

ผักพื้นบ้านที่ใช้ในงานวิจัยในส่วนของระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่มีการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีด้วยขั้วไฟฟ้าชนิดใหม่ ชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวป์ (Flow injection analysis with amperometric detection on GC/CNT electrode) มี 6 ชนิดได้แก่ ผักกระโดน ผักอีหลำ ผักแขยง ผักเม็ก ผักแพ้ว และ ผักติ้ว (รูป ชื่อท้องถิ่น และชื่อวิทยาศาสตร์ของผักพื้นบ้านแสดงในภาคผนวก ก., ตาราง ก-1) ส่วนผักพื้นบ้านที่ใช้ในส่วนของเทคนิควิเคราะห์มาตรฐาน (DPPH, ABTS และ FCR method) มี 11 ชนิดได้แก่ บัวบก ผักกระโดน ผักแขยง ผักชะพลู ผักเม็ก มะระขี้นก ผักแพ้ว ผักติ้ว ใบผักหวาน ใบย่านาง และดอกผักติ้ว (รูป ชื่อท้องถิ่น และชื่อวิทยาศาสตร์ของผักพื้นบ้านแสดงในภาคผนวก ก., รูป ก-1)

นำผักมาล้างทำความสะอาดแล้วผึ่งลมให้แห้ง แยกเอาเฉพาะส่วนใบ (และดอกสำหรับดอกผักติ้ว) อบที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมงด้วยตู้อบลมร้อน จนได้น้ำหนักที่คงที่ นำไปบดหรือปั่นให้ได้ตัวอย่างแห้งที่เป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุลงในภาชนะที่ปิดมิดชิด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -18 °C การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสารตัวอย่างพัฒนาจากวิธีของ S. Silva [11] โดยชั่งตัวอย่างแห้งหนัก 2.5 ± 0.0001 g มาสกัดเพื่อกำจัดเม็ดสี (pigment) และไข (wax) ด้วย เฮกเซนปริมาตร 25.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำกากที่เหลือมาสกัดด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 25.00 mL และ 2% $Na_2S_2O_5$ ปริมาตร 5.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำชั้นของเหลวที่สกัดได้มารวมกัน จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างในภาชนะสีชาที่มีฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิประมาณ 7 °C

### *2.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในตัวอย่าง*

#### *2.4.1 วิธี ABTS*

เก็บสารละลาย ABTS เข้มข้น 1,000 ppm ไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 (±0.02) ที่ความยาวคลื่น 734 nm (สารละลาย A)

ปิเปตสารละลาย A ปริมาตร 2.90 mL ใส่ใน cuvette เติมเมทานอลปริมาตร 0.10 mL ใน cuvette เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ($A_{Control}$)

สร้างกราฟมาตรฐานโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ( 50, 100, 150 และ 200 ppm) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน trolox แทนเมทานอล ($A_{Measure}$) คำนวณหาค่า % ABTS Radical Cation Scavenging Activity โดยใช้สมการที่ 1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อตระหว่างความเข้มข้นของ trolox กับค่า % ABTS Radical Cation Scavenging Activity

$$\%ABTS\ Radical\ Cation\ Scavenging\ Activity = \left[\frac{A_{Control} - A_{Measure}}{A_{Control}}\right] x100 \quad \text{..... (1)}$$

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรตัวอย่างแทนเมทานอล คำนวณหาค่า % ABTS Radical Cation Scavenging Activity และปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ mg of trolox / g of sample

### 2.4.2 วิธี DPPH

ปิเปตสารละลาย DPPH เข้มข้น 6 x $10^{-5}$ M ปริมาตร 2.90 mL ใส่ใน cuvette เติมเมทานอลปริมาตร 0.10 mL ใน cuvette เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ( $A_{CH_3OH}$ )

สร้างกราฟมาตรฐานโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ (50, 100, 150 และ 200 ppm) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน trolox แทนเมทานอล ( $A_{std}$ ) คำนวณหาค่า % DPPH Scavenging Activity โดยใช้สมการที่ 2 สร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อตระหว่างความเข้มข้นของ trolox กับค่า % DPPH Scavenging Activity

$$\%DPPH\ Scavenging\ Activity = \left[1 - \left(\frac{A_{std}}{A_{CH_3OH}}\right)\right] x\ 100 \qquad \text{..... (2)}$$

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรตัวอย่างแทนเมทานอล คำนวณหาค่า % DPPH Scavenging Activity และปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ mg of trolox / g of sample

### 2.4.3 วิธี Folin-Cioculteau

การวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์โดยวิธี Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) ทำการทดลองโดยเตรียม FCR โดยการนำ $Na_2WO_4.2H_2O$ 100 g , $Na_2WO_4.2H_2O$ 25 g, กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 100 mL และ กรด phosphoric acid เข้มข้น 85% ปริมาตร 50 mL ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2 L เติมน้ำปริมาตร 700 mL ให้ความร้อนจนเดือดนาน 10 ชั่วโมง จากนั้นเติม $Li_2SO_4.4H_2O$ 30 g จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1L เก็บในภาชนะทึบแสง และเก็บไว้ในที่เย็น

นำสารละลาย FCR มาเจือจางให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า (สารละลาย B)

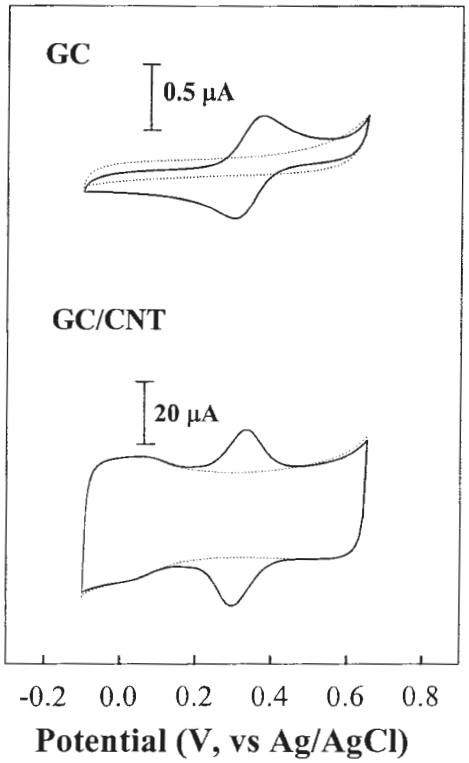
สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย B ปริมาตร 1.25 mL สารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.25 mL 7.5% $Na_2CO_3$ 1.00 mL และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรตัวอย่างแทนสารละลายมาตรฐาน gallic acid คำนวณหาค่าปริมาณรวมของงสารประกอบฟีโนลิกส์ในรูปของ mg of gallic / g of sample

## 3. ผลการทดลอง

### 3.1 Cyclic voltammetry of DPPH

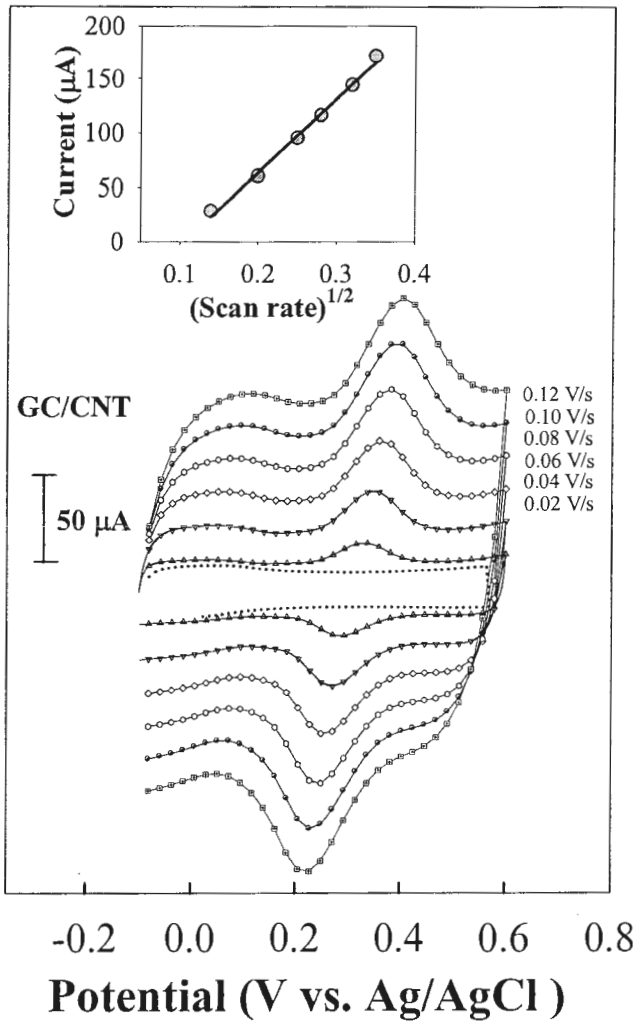
ศึกษาไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา และที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3




**รูปที่ 3** ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารอนุมูลอิสระ DPPH ที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดาและขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) (เส้นทึบ) และเส้นประแสดง background current (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%)

### *3.2 Scan rate dependence study*

ผลการทดลองของ scan rate dependence study ของสารอนุมูลอิสระ DPPH ที่ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) แสดงดังรูปที่ 4

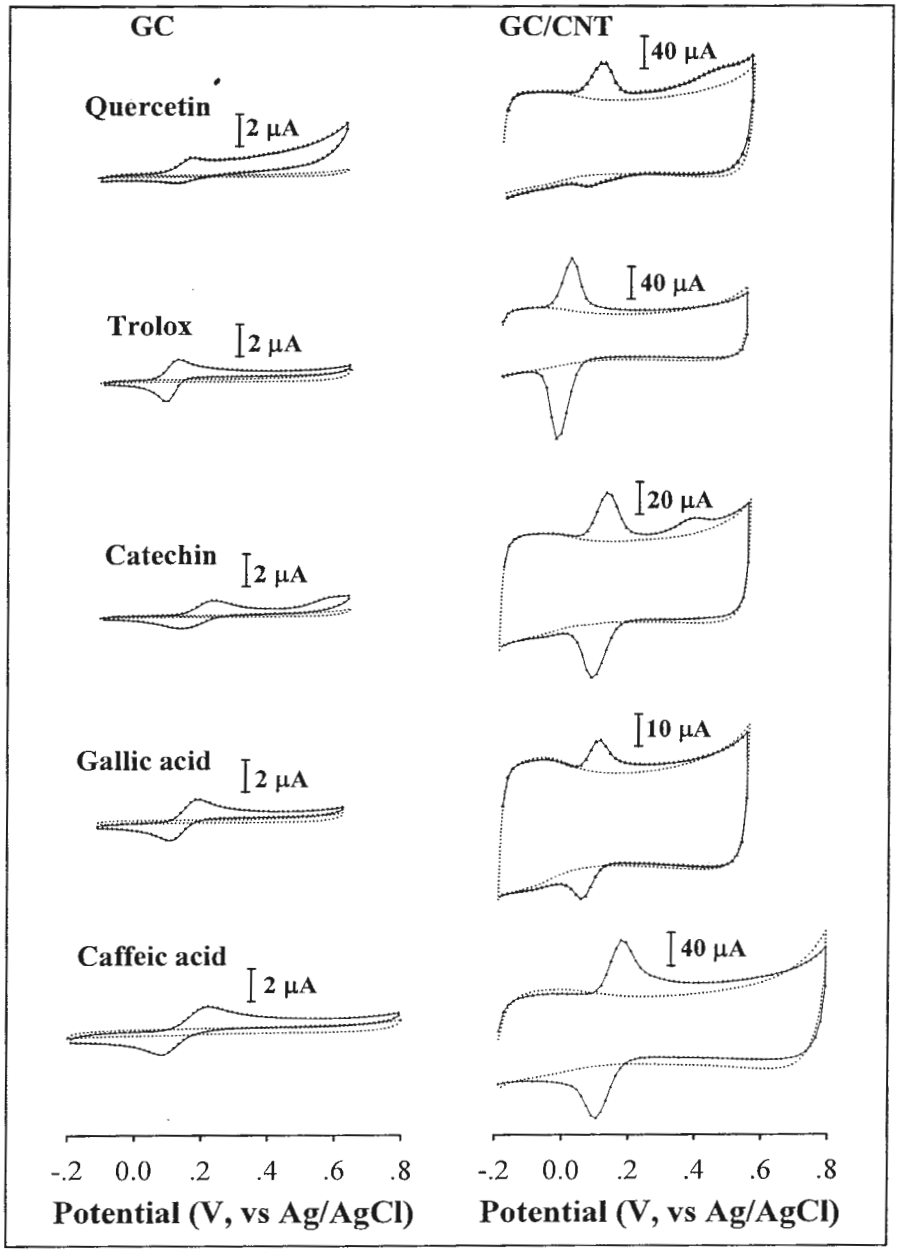



**<u>รูปที่ 4</u>** ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารอนุมูลอิสระ DPPH ที่อัตราเร็วในการแสกนค่าต่าง ๆ (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 และ 0.12 $VS^{-1}$) ที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) (เส้นทึบ) และ background current (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%) (เส้นประ)

จากผลการทดองในรูปที่ 4 จะเห็นว่าเมื่อใช้อัตราเร็วในการแสกนที่สูงขึ้นจะได้ค่ากระแสที่สูงขึ้น เมื่อนำค่ากระแสที่ได้มาพลอตกับค่าค่าสแคว์รูทของอัตราเร็วในการสแกน (ดังรูปแทรก) พบว่าค่ากระแสแปรผันตรงกับค่าสแคว์รูทของอัตราเร็วในการสแกน ($r^2$ = 0.994) แสดงว่าปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบ diffusion control process และไม่เกิดการดูดซับของที่ผิวของขั้วไฟฟ้า GC/CNT

### *3.3 Cyclic voltammetry of antioxidants*

การศึกษาไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระที่สนใจทั้ง 5 ชนิดได้แก่เช่น quercetin, trolox, catechin, gallic acid และ cafeic acid ได้ศึกษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40% ที่ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน(GC) ธรรมดาและที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5

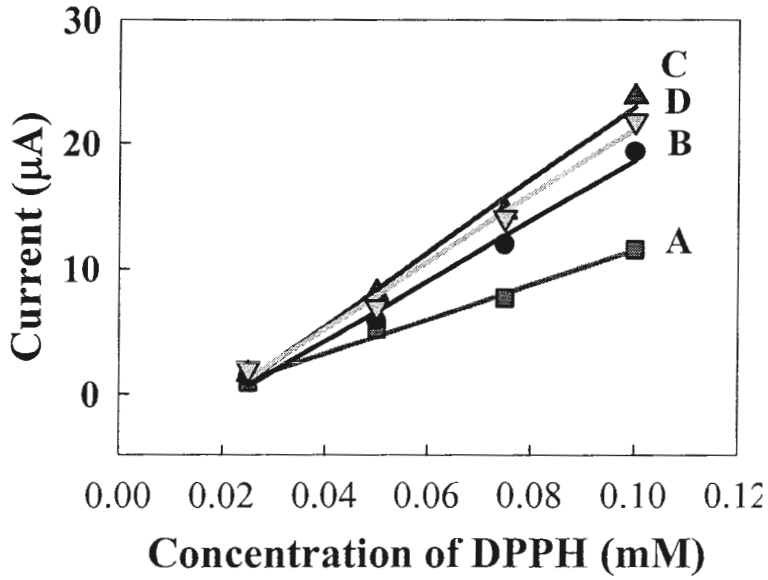



**รูปที่ 5** ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารต้านอนุมูลอิสระ 5 ชนิด (cafeic acid, gallic acid, catechin, trolox และ quercetin) ที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดาและที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) (เส้นทึบ) และ background current (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%) (เส้นประ)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการใช้ขั้วไฟฟ้าแบบกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา และที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) พบว่าไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากทั้งขั้วไฟฟ้า GC และ GC/CNT ให้พีคออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระที่สนใจทั้ง 5 ชนิดที่ชัดเจน แต่ในขั้วไฟฟ้า GC/CNT จะให้ค่า S/B ที่สูงกว่าในขั้วไฟฟ้า GC ประมาณ 8-30 เท่า แสดงว่าการวิเคราะห์ด้วยขั้วไฟฟ้า GC/CNT จะให้สภาพไวในการวิเคราะห์ที่สูงกว่า

### *3.4 Effect of CNT modified amount on the detection of DPPH*

ผลของของปริมาณ CNT ที่ใช้ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน ที่มีต่อการวิเคราะห์หาปริมาณของ DPPH แสดงดังรูปที่ 6




<u>รูปที่ 6</u> กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ DPPH โดยใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยสารละลายคาร์บอนนาโนทิวบ์ (2 mg/mL in DMF) ปริมาตรต่าง ๆ (A) 10, (B) 20, (C) 30 และ (D) 40 μL

จากผลการทดลอง เมื่อใช้ปริมาณ CNT ในการดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนมากขึ้น จาก 10 - 40 μL พบว่าค่ากระแสของ DPPH ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น และค่ากระแสของ background current (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%) ก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย โดยเมื่อนำค่า S/B มาพลอตกราฟมาตรฐานในรูปที่ 4 พบว่าปริมาตรของ CNT ในการดัดแปรที่ให้สภาพความไว (Sensitivity) สูงที่สุดคือ 30 μL ดังนั้นปริมาตรของ CNT ที่เหมาะสมในการการดัดแปรขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนคือ 30 μL

### *3.5 Amperometric detection of antioxidant capacity*

ในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแบบแอมเพอร์โรเมทรีจะติดตามปริมาณของสารอนุมูลอิสระ ($DPPH^{\bullet}$) โดยถ้าเติมสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) สารต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 3

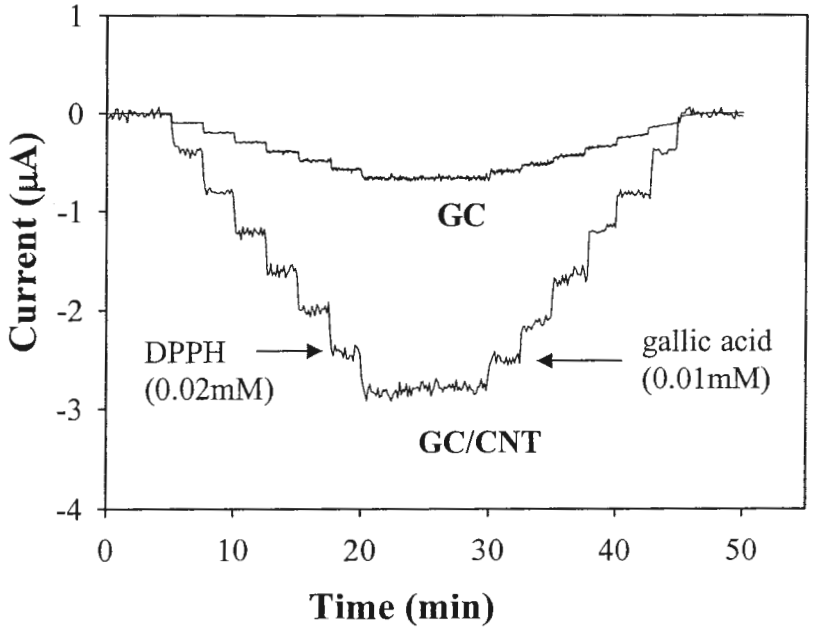
$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH - H + A^{\bullet} \qquad (3)$$

ทำให้ปริมาณของสารอนุมูลอิสระมีปริมาณลดลง การวัดปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจึงวัดได้จากการลดลงของสัญญาณจาก $DPPH^{\bullet}$

### *3.5.1 Chronoamperometry*

การทดลองวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแบบแอมเพอร์โรเมทรีด้วยเทคนิค chronoamperometry ที่ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา เปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 7

รูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่าค่ากระแสของ $DPPH^{\bullet}$ จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมสารละลายมาตรฐาน $DPPH^{\bullet}$ (0.02 mM) (ด้านซ้ายของ chronoamperogram) และค่ากระแสจะมีค่าลดลงเมื่อมีการเดิมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid (0.01 mM) (ด้านขวาของ chronoamperogram)

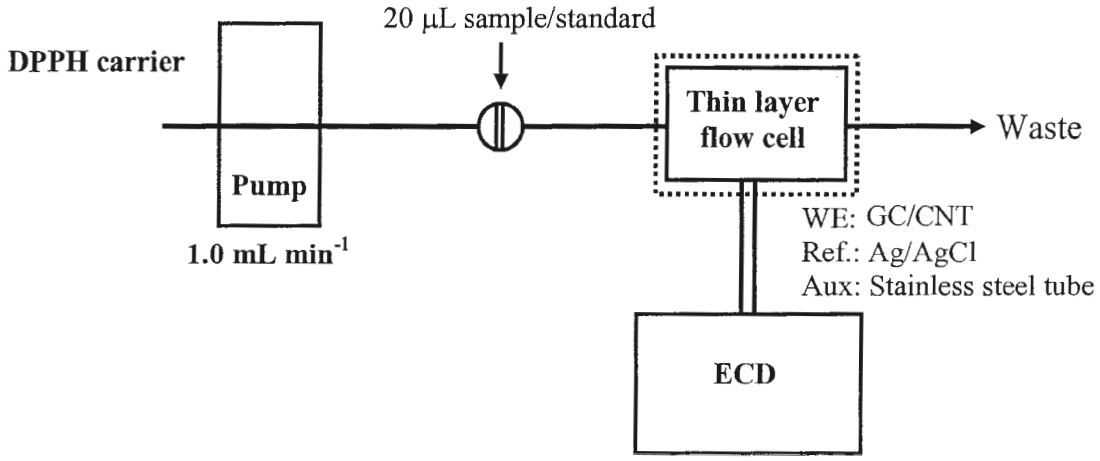



**รูปที่ 7** สัญญาณค่ากระแสของสารละลายมาตรฐาน $DPPH^{\bullet}$ที่ได้จากการทดลองโดยใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดา เปรียบเทียบกับที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) รูปด้านซ้ายเกิดจากการทดลองเติมสารละลายมาตรฐาน $DPPH^{\bullet}$ เข้มข้น 0.02 mM ทุก ๆ 4 นาที และ ด้านขวาเมื่อมีการทดลองเติมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0.01 mM ทุก ๆ 4 นาที

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการใช้ขั้วไฟฟ้าแบบกลาสซีคาร์บอน (GC) ธรรมดาและที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) พบว่าขั้วไฟฟ้า GC/CNT ให้ค่ากระแสที่สูงกว่าในขั้วไฟฟ้า GC ประมาณ 4 เท่า และขั้วไฟฟ้า GC/CNT จะให้สัญญาณที่มีความเสถียรมากกว่า

### *3.5.2 Flow Injection Analysis with amperometric detection on GC/CNT electrode*

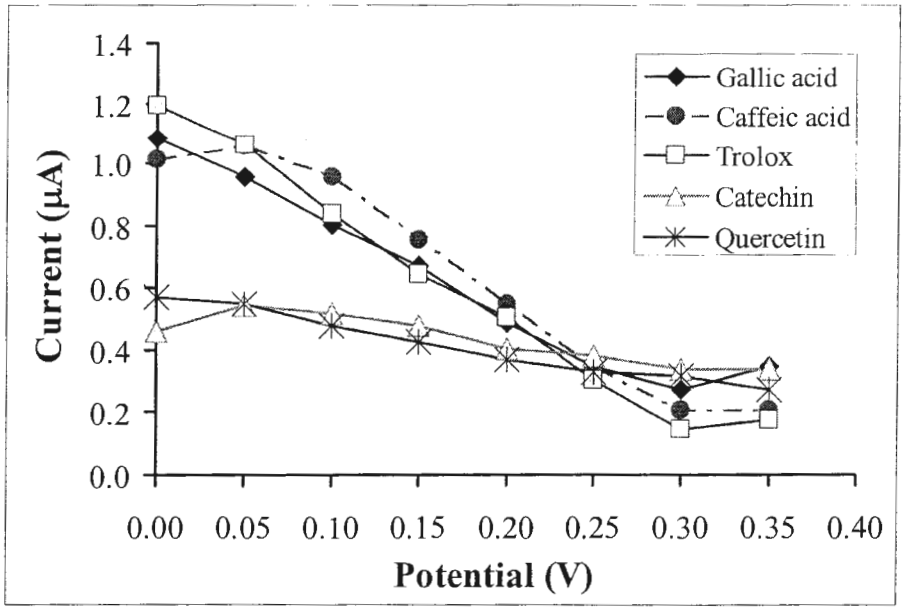
ผลการทดลองจากการวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT แสดงให้เห็นว่าเทคนิควิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นให้สัญญาณที่มีความเสถียร และมีสภาพไวสูง ได้นำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคโฟลอินเจคชันอะนาลิซิส (รูปที่ 8) เพื่อใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAC) ในตัวอย่างสารสกัดจากพืช




**รูปที่ 8** แผนภาพแมนนิโฟล์ดของระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าแบบกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ที่พัฒนาขึ้น (carrier, 0.25 mM DPPH ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH = 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%)

### *3.5.3 Optimum potential for amperometric detection (Hydrodynamic voltammetry)*

ผลการทดลองเพื่อหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระของระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้าแบบกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) แสดงดังรูปที่ 9



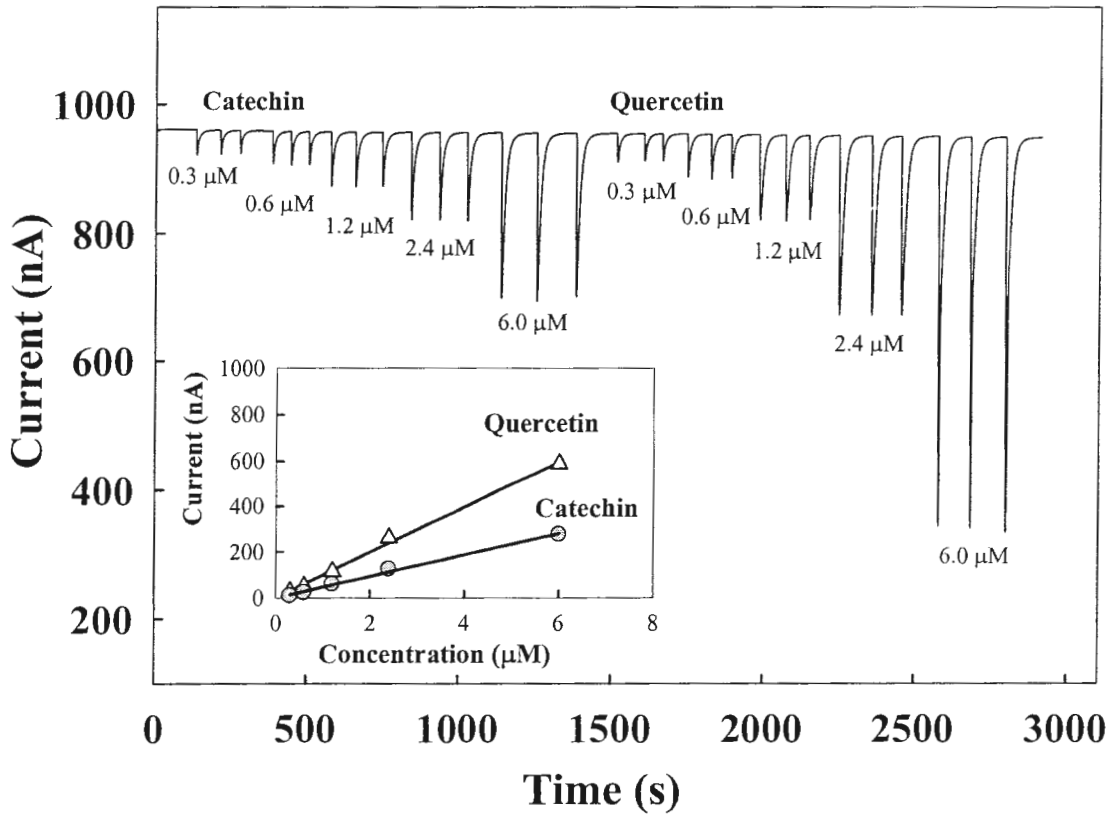

**รูปที่ 9** ไฮโดรไดนามิกโวแทมเมทรีจากการฉีดสารต้านอนุมูลอิสระ 5 ชนิดลงในระบบะบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT (antioxidant standard concentrations, 2.5 µM;

carrier, 0.25 mM DPPH ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH = 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%; injection volume, 20 µL; flow rate, 1.0 mL/min)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อศักย์ไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้นค่ากระแสที่ได้จากทดลองในสารต้านอนุมูลอิสระเกือบทุกชนิดมีค่าลดลง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 0.05 V เป็นค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรี เพราะให้สภาพไวสูงในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระเกือบทุกชนิด และที่ศักย์ไฟฟ้านี้ค่ากระแสของสารละลายที่ใช้เป็น carrier (0.25 mM DPPH ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH = 7.4 ที่มี KCl ความเข้มข้น 0.03 M และเอทานอล 40%) ให้ค่าที่ค่อนข้างคงที่ ในเวลาที่ไม่นานนัก

### *3.6 Analytical features of the developed method*

ได้ทดลองเพื่อหาคุณลักษณะของระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 10




**รูปที่ 10** ตัวอย่างสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT ที่ได้พัฒนาขึ้น (ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ catechin และ quercetin ในกราฟมาตรฐานคือ 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 และ 6.0 µM)

ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT สรุปได้ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT ที่ใช้ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

| Antioxidant compounds | Linear range (μM) | Calibration plot parameter | | | Precision (RSD)[a] | Limit of detection[b] (μM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Intercept (nA) | Slope (nA/μM) | $r^2$ | | |
| Quercetin | 0.3-6 | 7.5 | 110.5 | 0.995 | 1.46 | 0.03 |
| Catechin | 0.3-6 | 9.1 | 85.9 | 0.993 | 1.47 | 0.02 |
| Caffeic acid | 0.6-12 | 19.8 | 760.3 | 0.996 | 2.04 | 0.08 |
| Gallic acid | 0.6-12 | 15.9 | 58.6 | 0.996 | 1.27 | 0.04 |
| Trolox | 0.3- 8 | 14.9 | 80.1 | 0.996 | 1.17 | 0.04 |

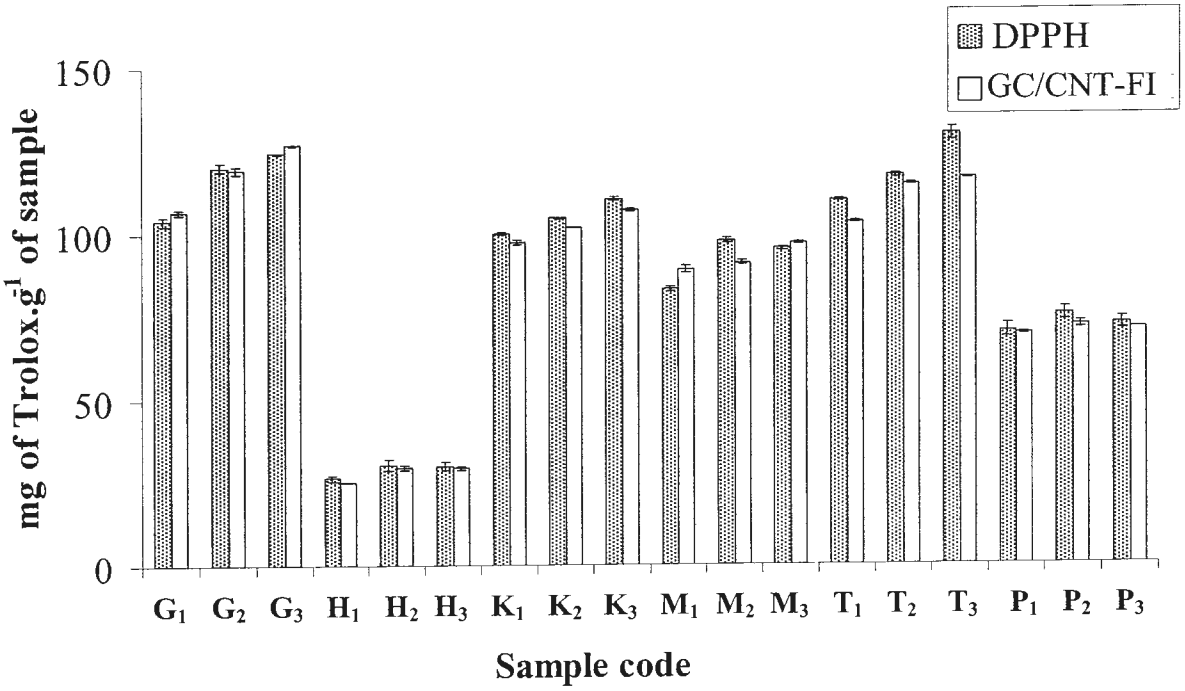
[a]Calculated from the signal of 0.8 μM of each antioxidant standard (n=3).

[b]Calculated from 3σ (n=10) of the signals from the lowest concentration of each working range.

### 3.7 *Application of the developed method to Thai indigenous vegetable extracts*

ในการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะทำโดยการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (TAC) ในตัวอย่างสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรไทย 6 ชนิด (กระโดน, อีหลำ, แขยง, เม็ก, แพ้ว และติ้ว) ***รายละเอียดดังภาคผนวก ก, ตาราง ก-1*** ซึ่งซื้อจากร้านค้าของชุมชนในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2551 นำผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ได้แก่ วิธีการวัดโดยใช้สารอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ ที่มีการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปคโทรโฟโตเมทรี ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 11

รูปที่ 11 แสดงผลลัพธ์วิเคราะห์ของค่า TAC จากระบบการวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT (GC/CNT-FI) และวิธีวิธีมาตรฐานแบบ DPPH$^{\bullet}$ ที่มีการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปคโทรโฟโตเมทรีที่วิเคราะห์ได้ จากตัวอย่างสารสกัดจากผักและพืชสมนไพรไทย 6 ชนิด จากการทดลองพบว่าปริมาณ TAC ที่พบในสารสกัดเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ผักติ้ว~ ผักกระโดน > แขยง > เม็ก > แพ้ว > ผักอีหลำ ตามลำดับ ค่า TAC ที่พบปริมาณสูงในผักติ้วสอดคล้องกับผลการทดลองของ P. Maisuthisakul และคณะ [17] ซึ่งได้รายงานผลการประเมินหาปริมาณ TAC ในสารสกัดสารสกัดจากผักติ้วโดยเทคนิค DPPH โดยพบปริมาณ TAC ในผักติ้วที่สูง และผลจากการทดสอบด้วยสถิติ *t*-test พบว่า ผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคที่พัฒนาขึ้น (GC/CNT-FI) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลลัพธ์วิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคมาตรฐาน (DPPH) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $t_{observed}$ = 1.9054, เมื่อ $t_{critical}$ = 2.1098)




**<u>รูปที่ 11</u>** ค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ของค่า TAC ที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรทั้ง 6 ชนิด (ตัวอย่างละ 3 replicate) จากการวิเคราะห์ด้วยระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT (GC/CNT-FI) และวิธีวิธีมาตรฐานแบบ DPPH$^{\bullet}$ที่มีการตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปคโทรโฟโตเมทรี

### *3.8 ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS และวิธี DPPH Radical Scavenging Activity*

นำตัวอย่างผักและพืชสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดได้แก่ บัวบก ผักกระโดน ผักแขยง ผักชะพลู ผักเม็ก มะระขี้นก ผักแพ้ว ผักติ้ว ใบผักหวาน ใบย่านาง และดอกผักติ้ว ***รายละเอียดดังภาคผนวก ก, รูป ก-1*** ซึ่งซื้อจากร้านค้าของชุมชนในเขตจังหวัดอุบลราชธานีในช่วงเดือนมีนาคม 2552 มาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดมา 3 ส่วนเพื่อสกัด (3 replicates) และทำการวิเคราะห์แต่ละ replicate 3 ซ้ำ ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี ABTS และ DPPH แสดงดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ค่าผลลัพธ์วิเคราะห์จากการประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS ในผักและสมุนไพร จำนวน 11 ชนิด ในจังหวัดอุบลราชธานี ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่า mean ± S.D. (n = 3)

| รหัสและชนิดพืช | ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (mg of trolox / g of sample) | |
|---|---|---|
| | วิธี DPPH | วิธี ABTS |
| **B – 01** บัวบก | 33.63 ± 2.54 | 103.44 ± 0.52 |
| **G – 01** ผักกระโดน | 463.54 ± 2.70 | 550.40 ± 0.55 |
| **K – 01** ผักแขยง | 189.19 ± 3.13 | 163.54 ± 4.73 |
| **M – 01** ผักเม็ก | 397.25 ± 11.24 | 512.24 ± 17.09 |
| **M – 02** มะระขี้นก | 61.82 ± 1.78 | 116.71 ± 0.93 |
| **P – 01** ผักแพ้ว | 266.94 ± 18.06 | 192.37 ± 5.52 |
| **S – 01** ผักชะพลู | 30.35 ± 0.64 | 94.72 ± 1.59 |
| **T – 01** ผักติ้ว | 276.52 ± 4.61 | 336.47 ± 1.43 |
| **T – 02** ดอกผักติ้ว | 143.24 ± 8.36 | 124.48± 2.59 |
| **W – 01** ใบผักหวาน | 31.06 ± 0.90 | 116.49 ± 3.14 |
| **Y – 01** ใบผักย่านาง | 114.49 ± 3.45 | 178.40 ± 9.37 |

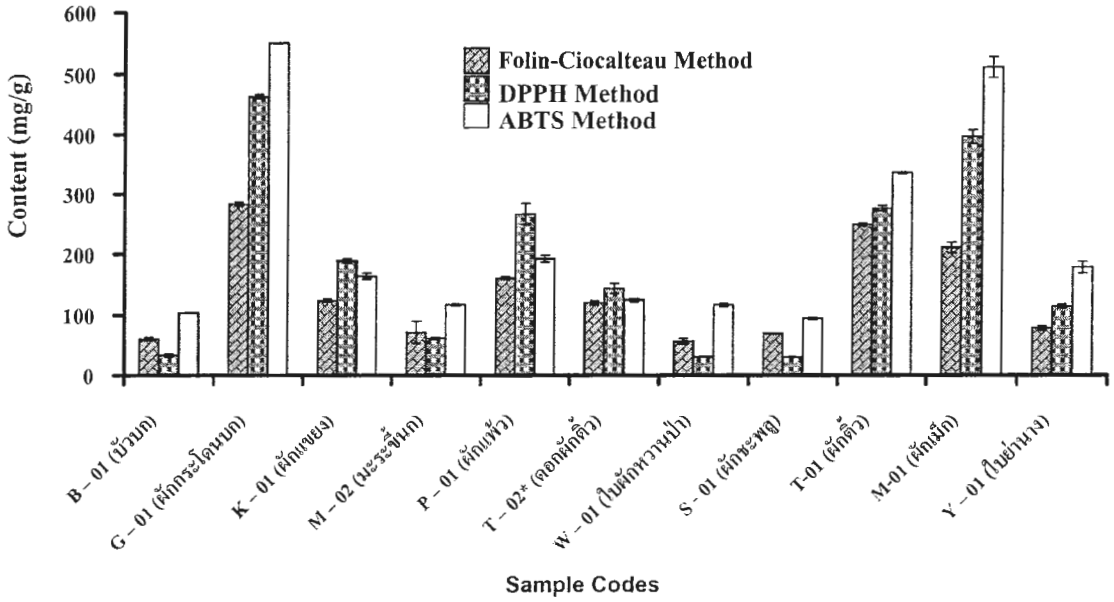
ผลการทดลองพบว่าปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี ABTS เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดน (550.40) > ผักเม็ก (512.24) > ผักติ้ว (336.47) > ผักแพ้ว (192.37) > ใบย่านาง (178.40) > ผักแขยง (163.54) > ดอกผักติ้ว (124.48) > มะระขี้นก (116.71) ~ใบผักหวาน (116.49) > บัวบก (103.44) > ผักชะพลู (94.72) mg of trolox / g of sample

ส่วนปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและสมุนไพรด้วยวิธี DPPH เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดน (463.54) > ผักเม็ก (397.25) > ผักติ้ว (276.52) > ผักแพ้ว (266.94) > ผักแขยง (189.19) > ดอกผักติ้ว (143.24) > ใบย่านาง (114.49) > มะระขี้นก (61.82) > บัวบก (33.63) ~ ใบผักหวาน (31.06) ~ ผักชะพลู (30.35) mg of trolox / g of sample โดยแนวโน้มของปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระนั้นพบว่าส่วนใหญ่แล้ววิธี ABTS มักให้ปริมาณสูงกว่าวิธี DPPH ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาสูง ในขณะที่วิธี DPPH ใช้อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีเสถียรภาพที่สูงกว่า [6] ด้วยเหตุนี้เองสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความแรงหรือว่องไวที่น้อยกว่าจึงไม่ได้ทำปฏิกิริยา $DPPH^{\bullet}$ ทำให้ผลการตรวจประเมินด้วยวิธี DPPH ที่ได้จึงมีปริมาณการตรวจพบที่ต่ำกว่า เมื่อนำผลการทดลองของเทคนิค ABTS และ DPPH มาเปรียบเทียบกัน เพบว่า ผลลัพธ์วิเคราะห์จากทั้งสองเทคนิคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เมื่อทดสอบด้วย *t*-test ($t_{observed}$ = 2.515, $t_{critical}$ = 3.169) และลำดับของปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและพืชสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดที่ได้จากทั้งสองเทคนิคมีความสอดคล้องกัน

### *3.9 ปริมาณรวมของสารฟีโนลิกส์โดยวิธี Folin-Ciocalteau*

ผลการทดลองพบว่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี Folin-Ciocalteau เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดน (283.45) > ผักติ้ว (248.96) > ผักเม็ก (211.40) > ผักแพ้ว(160.22) > ผักแขยง (123.37) > ดอกผักติ้ว (119.69) > ใบย่านาง (78.61) > มะระขี้นก (71.74) ~ ผักชะพลู (69.84), บัวบก (60.83) ใบผักหวาน (56.80) mg of gallic acid / g of sample

เมื่อเปรียบเทียบค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธี DPPH, ABTS และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์จากวิธี Folin-Ciocalteau ในตัวอย่างผักและพืชสมุนไพร 11 ชนิด (รูปที่ 12) ผักกระโดน ผักเม็ก และ ผักติ้วซึ่งมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูง (3 ลำดับแรก) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ สูงเป็น 3 ลำดับแรกเช่นกัน คือ ผักกระโดน (283.45) ผักติ้ว (248.96) และ ผักเม็ก (211.40) ผลการทดลองจากปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบมากในผักติ้วสอดคล้องกับผลการศึกษา [12,13] ซึ่งรายงานว่าสารประกอบฟีโนลิกส์หลักที่พบในผักติ้วคือ chlorogenic acid




**<u>รูปที่ 12</u>** แผนภาพการเปรียบเทียบค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธี DPPH , ABTS และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์จากวิธี Folin-Ciocalteau ในตัวอย่างผักพื้นบ้าน 11 ชนิด (ในจังหวัดอุบลราชธานี)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากทั้ง 3 วิธีพบว่าสามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตามปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็น 3 ประเภทคร่าว ๆ ดังนี้ 1) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ ผักกระโดนบก ผักเม็ก และ ผักติ้วป่า 2) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ได้แก่ ผักแพ้ว ใบย่านาง ผักแขยง และ ดอกผักติ้ว 3) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ มะระขี้นก บัวบก ใบผักหวานป่า และ ผักชะพลู ผลลัพธ์วิเคราะห์จากตัวอย่างผักพื้นบ้านทั้ง 11 ชนิด ส่วนใหญ่พบว่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์นั้นสอดคล้องกับปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่เคยมีการรายงานมาแล้ว [14-16] สรุปได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ในผักและพืชสมุนไพรเหล่านี้มีองค์ประกอบที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีโนลิกส์

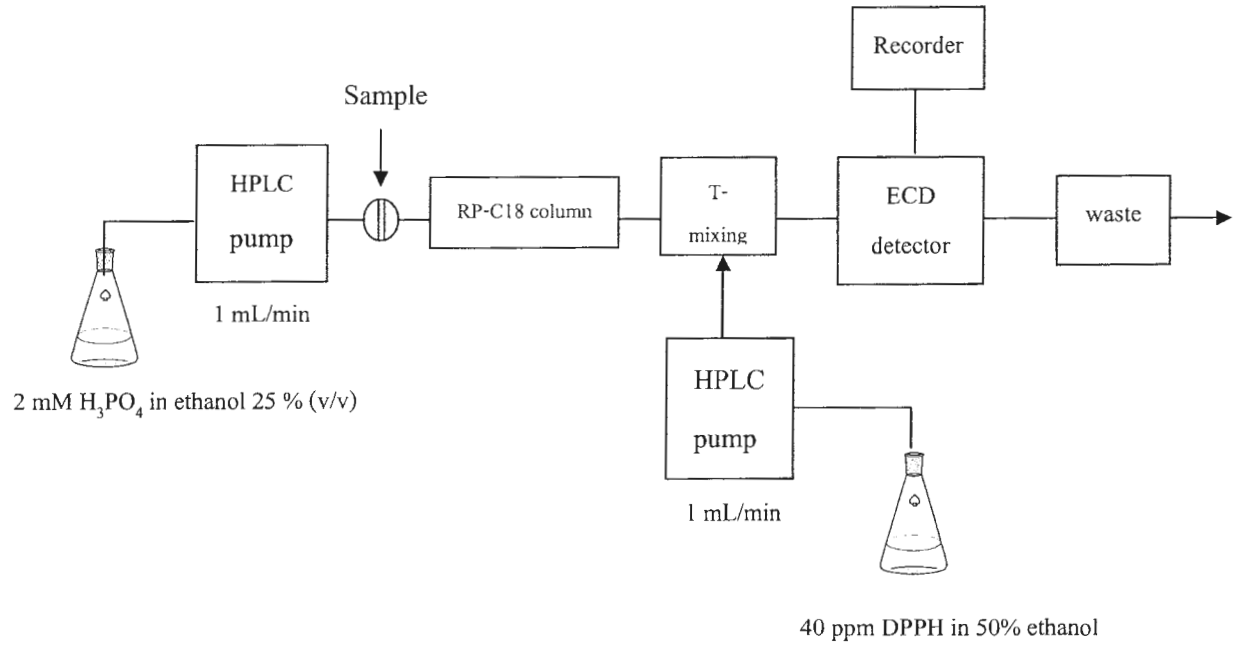
จากผลการทดลองเพื่อประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS และ DPPH และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์โดยวิธี Folin-Ciocalteau ในผักและพืชสมุนไพร 11 ชนิดที่นิยมบริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี พบว่าผักและสมุนไพรที่นำมาศึกษามีสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกส์เป็นองค์ประกอบ และสามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตามปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็น 3 ประเภทดังนี้ 1) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ ผักกระโดนบก และผักเม็ก 2) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระปานกลางได้แก่ ผักติ้ว ผักแพ้ว ใบย่านาง ผักแขยง ดอกผักติ้ว และ 3) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ มะระขี้นก บัวบก ใบผักหวานป่า และ

ผักชะพลู ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกส์ ที่พบในผักและสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดมีค่าที่แตกต่างกันตั้งแต่เพียงเล็กน้อยจนถึงประมาณเกือบ 10 เท่าขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยสามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตามปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็น 3 ประเภทคร่าว ๆ ดังนี้ 1) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ ผักกระโดนบก ผักเม็ก และ ผักติ้ว 2) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ได้แก่ ผักแพ้ว ใบย่านาง ผักแขยง และ ดอกผักติ้ว 3) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ มะระขี้นก บัวบก ใบผักหวานป่า และ ผักชะพลูนอกจากนี้ จากผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัย [14-16] ที่พบว่าผักและสมุนไพรที่มีสารประกอบฟีโนลิกส์สูง มักมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมด้วย ผลลัพธ์วิเคราะห์จากการทดลองในผักและพืชสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการเลือกรับประทานผักและสมุนไพรเหล่านี้ให้เหมาะสมกับความต้องการ

## *3.10 การวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี*

### 3.10.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีด้วยขั้วไฟฟ้าชนิดกลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวป์ในเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

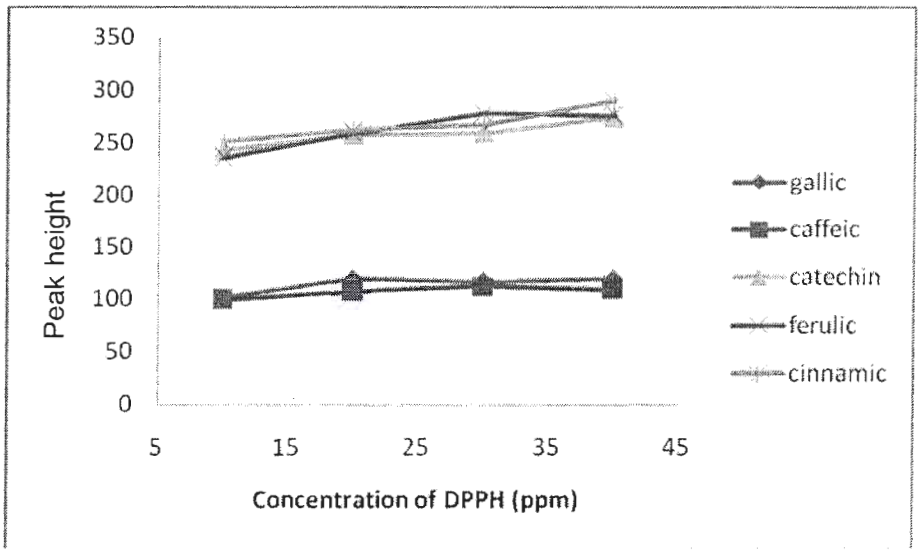
ได้นำผลการทดลองจากเทคนิควิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้น การวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT ไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดในเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เพื่อพัฒนามาใช้เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัดจากพืช ระบบวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีการวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT สำหรับวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังรูปที่ 13




**<u>รูปที่ 13</u>** แผนภาพระบบวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT สำหรับวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาขึ้น

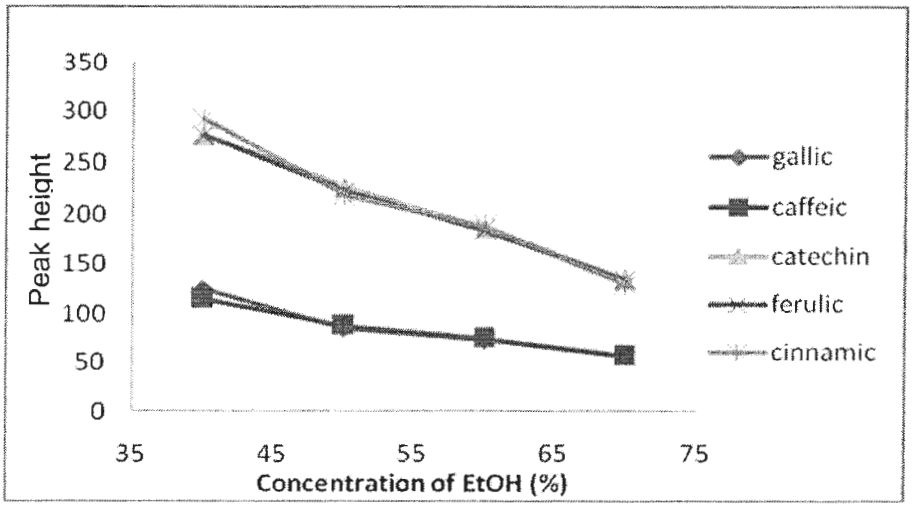
***การศึกษาหาความเข้มข้นของ DPPH และเอทานอล ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด***

ในการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT ความเข้มข้นของ DPPH และเอทานอลมีผลต่อค่ากระแสได้จากการตรวจวัด จึงได้มีการทดลองหาความเข้มข้นของสาร DPPH และเอทานอลที่เหมาะสมในการตรวจวัด โดยการวัดสัญญาณของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 ppm ในเอทานอล 40% ในระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสที่มีระบบตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีตามรูปที่ 8 แล้วนำค่าความสูงของพีคค่ากระแสที่ได้ (peak height) มาพลอตกับความเข้มของสารละลาย DPPH ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14




**รูปที่ 14** การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT

จากผลการทดลองในรูปที่ 14 พบว่าเมื่อปริมาณของสารละลาย DPPH เพิ่มขึ้นสัญญาณที่ตรวจวัดได้จะเพิ่มขึ้นด้วย ในการทดลองความเข้มข้นสารละลาย DPPH ที่เหมาะสมคือ 40 ppm ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH มาก ปัญหาที่พบคือการละลายของ DPPH จะลดลง ดังนั้นในการทดลองจึงมีการศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลาย DPPH เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจวัด ผลการการศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลแสดงดังรูปที่ 15




**รูปที่ 15** การศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT

จากผลการทดลองในรูปที่ 15 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่ม สัญญาณที่ตรวจวัดได้จะลดลง ในการทดลองนี้เลือก 50% เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม เนื่องจากถ้าปริมาณเอทานอลน้อยเกินไป DPPH จะละลายได้ไม่ดี แต่ถ้าปริมาณมากจะให้สัญญาณตรวจวัดไม่ดี

### *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกของสารละลายมาตรฐานสารต้านอนุมูลอิสระ*

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกของสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี มีวัตถุประสงค์เพื่อให้สารผสมที่วิเคราะห์ให้ค่าการแยกที่ดี (resolution สูง) ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น และช่วยเพิ่มความจำเพาะของการวิเคราะห์โดยการแยกสารที่สนใจออกจากสารรบกวนอื่นๆ ซึ่งตรวจสอบได้จากโครมาโตแกรม ในการทดลองนี้ใช้ระบบ reversed-phase chromatography โดยใช้เฟสคงที่เป็น C18 และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างกรด $H_3PO_4$ และเอทานอล โดยในการการศึกษาจะทำการทดลองโดยเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้สารละลายกรด $H_3PO_4$ ความเข้ม 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 ppm ในเอทานอล 20% ใช้ตัวตรวจวัดเป็นชนิด photodiode array (PDA) ที่ความยาวคลื่นช่วง UV ที่ 280 nm ซึ่งจะศึกษาอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่มีต่อการแยกของสาร ต้านอนุมูลอิสระ 5 ชนิด ได้แก่ Gallic acid, Catechin, Caffeic acid, p-coumaric acid และ Ferulic acid ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** การศึกษาอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ (กรด $H_3PO_4$ และ เอทานอล) ที่มีต่อการแยกสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระผสม

| Antioxidants | ความเข้มข้น $H_3PO_4$ (mM) | Retention time ($t_R$) (min) | Resolution (Rs) |
|---|---|---|---|
| Gallic acid | **0.5** | 2.485 | 0.59 |
| Catechin | | 2.720 | 5.86 |
| Caffeic acid | | 5.504 | 5.37 |
| p-coumaric acid | | 8.992 | 0.76 |
| Ferulic acid | | 9.525 | - |
| Gallic acid | **1.0** | 2.315 | 1.00 |
| Catechin | | 2.741 | 5.38 |
| Caffeic acid | | 5.429 | 6.17 |
| p-coumaric acid | | 8.821 | 1.2 |
| Ferulic acid | | 9.632 | - |
| Gallic acid | **2.0** | **2.240** | **1.17** |
| Catechin | | **2.677** | **5.43** |
| Caffeic acid | | **5.120** | **5.66** |
| p-coumaric acid | | **8.235** | **1.16** |
| Ferulic acid | | **8.992** | **-** |
| Gallic acid | **3.0** | 2.240 | 1.04 |
| Catechin | | 2.709 | 5.60 |
| Caffeic acid | | 5.227 | 5.91 |
| p-coumaric acid | | 8.480 | 1.16 |
| Ferulic acid | | 9.237 | - |

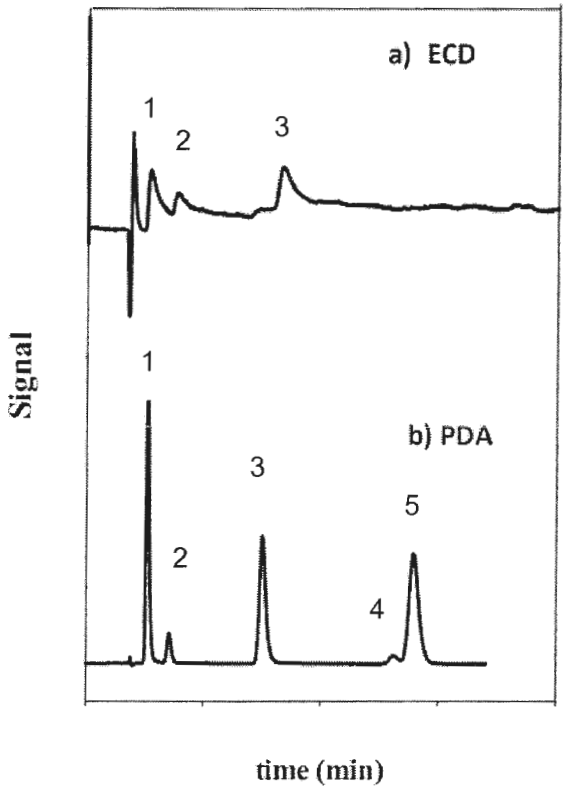
จากตารางที่ 3 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรด $H_3PO_4$ ในเฟสเคลื่อนที่จะทำให้การแยกเกิดขึ้นได้ดีขึ้น โดยความเข้มข้นของกรด $H_3PO_4$ ที่จะให้ค่าการแยกของสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 5 ชนิดดีในเวลาที่สั้นที่สุด คือกรด $H_3PO_4$ ความเข้มข้น 2.0 mM งานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของกรด $H_3PO_4$ เท่ากับ 2.0 mM เป็นค่าที่เหมาะสม

การศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการแยกสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระผสมผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอทานอลที่มีต่อการแยกสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระผสม

| Antioxidants | ความเข้มข้นของเอทานอล (% v/v) | Retention time ($t_R$) (min) | Resolution ($R_s$) |
|---|---|---|---|
| Gallic acid | **15** | 3.029 | 9.77 |
| Catechin | | 5.675 | 17.89 |
| Caffeic acid | | 11.883 | 21.15 |
| p-coumaric acid | | 22.891 | 2.28 |
| Ferulic acid | | 24.427 | - |
| Gallic acid | **20** | 2.688 | 5.50 |
| Catechin | | 4.064 | 13.35 |
| Caffeic acid | | 8.597 | 16.06 |
| p-coumaric acid | | 16.224 | 0 |
| Ferulic acid | | 16.224 | - |
| Gallic acid | **25** | **2.315** | **1.14** |
| Catechin | | **2.741** | **5.97** |
| Caffeic acid | | **5.429** | **5.65** |
| p-coumaric acid | | **8.821** | **1.16** |
| Ferulic acid | | **9.632** | - |
| Gallic acid | **27** | 2.197 | 0.62 |
| Catechin | | 2.475 | 4.20 |
| Caffeic acid | | 4.576 | 4.73 |
| p-coumaric acid | | 7.061 | 1.04 |
| Ferulic acid | | 7.787 | - |

จากตารางที่ 4 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลลดลงจะให้ค่าการแยกของสารต้านอนุมูลอิสระผสมทั้ง 5 ชนิดดีขึ้น แต่จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเอทานอล เป็น 25% (v/v) ซึ่งจะให้ค่าการแยกเหมาะสมที่ดีในเวลาที่สั้นที่สุด




**รูปที่ 16** โครมาโทแกรมของสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานผสมทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ Gallic acid, Catechin, Caffeic acid, p-hydroxycinnamic และ Ferulic acid ความเข้มข้น 20 ppm a) ในการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT และ b) PDA ที่ความยาวคลื่น 280 nm (พีคที่1: Gallic acid, 2: Catechin, 3:Caffeic acid, 4: p-hydroxycinnamic และ 5: Ferulic acid ตามลำดับ)

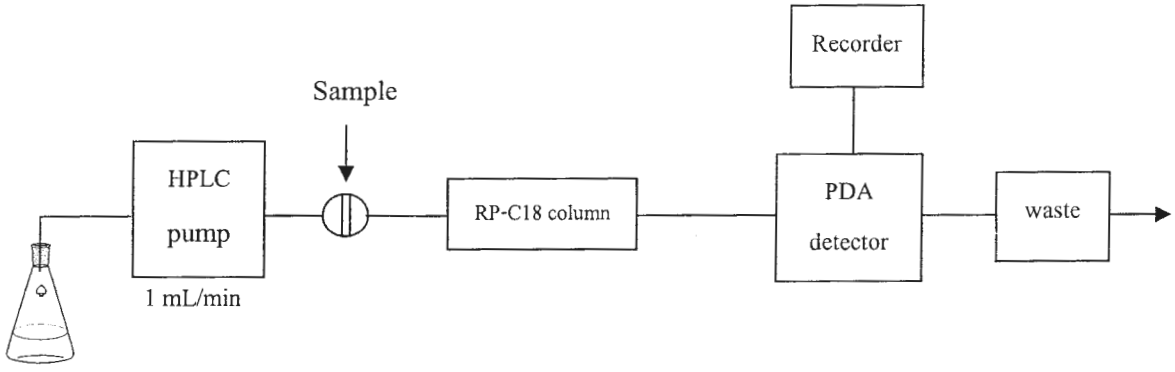
จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 16 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบสภาพไวของการตรวจวัดด้วยเทคนิคแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT และ แบบการดูดกลืนแสงด้วยตัวตรวจวัด PDA ที่ความยาวคลื่น 280 nm พบว่าเทคนิคการตรวจวัด PDA มีสภาพไวที่สูงกว่าและรูปร่างของพีคในโครมาโทแกรมมีสมมาตรมากกว่า ในการวิเคราะห์ด้วยการตรวจวัดชนิด PDA สามารถเห็นสัญญาณของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานความเข้มข้น 20 ppm จำนวน 5 ชนิดได้แก่ Gallic acid, Catechin, Caffeic acid, p-hydroxycinnamic และ Ferulic acid แต่ในการตรวจวัดด้วยเทคนิคแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT เห็นสัญญาณของสารต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 4 ชนิดได้แก่ Gallic acid, Catechin และ Caffeic acid ซึ่งสาเหตุที่การตรวจวัดด้วยเทคนิคแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT มีสภาพไวที่ต่ำกว่าอาจเนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระที่ถูกแยกจากกันที่คอลัมน์เมื่อมาทำปฏิกิริยากับสาร DPPH ก่อนถูกนำไปตรวจวัดที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระถูกเจือจางลงครึ่งหนึ่งทำให้สัญญาณที่ได้มีสภาพไวต่ำกว่า

ในส่วนของการประยุกต์เพื่อนำเทคนิคตรวจวัดที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นระบบตรวจวัดในเครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ปัญหาที่เกิดขึ้นคือสัญญาณที่ได้จากเครื่องตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีค่อนข้างต่ำ จึงได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมใหม่ ได้ทำการทดลองเพื่อแก้ปัญหาเรื่องสภาพไวของการตรวจวัดด้วยเทคนิคแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT หลังจากสารถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ โดย

ได้ปรับอัตราการไหลของสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 40 ppm ในเอทานอล 50% เมื่อมาทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระก่อนถูกนำไปตรวจวัดที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT และได้ทดลองโดยเพิ่มขดผสม (mixing coil) แทนตัวผสมรูปตัวที (T-mixing) ในแผนภาพระบบวิเคราะห์รูปที่ 13 เพื่อให้สารทำปฏิกิริยากันดีขึ้นก่อนนำไปตรวจวัดที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้พบว่าสภาพไวของการวิเคราะห์ยังไม่เพิ่มขึ้นมากนัก จึงได้เลือกเทคนิคการตรวจวัดชนิด PDA :ซึ่งเป็นระบบการตรวจวัดแบบ UV-VIS spectrophotometer ในเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีแทน เพื่อทดลองตรวจวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบหลัก ๆ ในสารสกัดจากพืชสมุนไพร

### 3.10.2 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด PDA ในเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

แผนภาพของระบบวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่ใช้การตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด PDA แสดงดังรูปที่ 17




**รูปที่ 17** แผนภาพระบบวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด PDA สำหรับวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

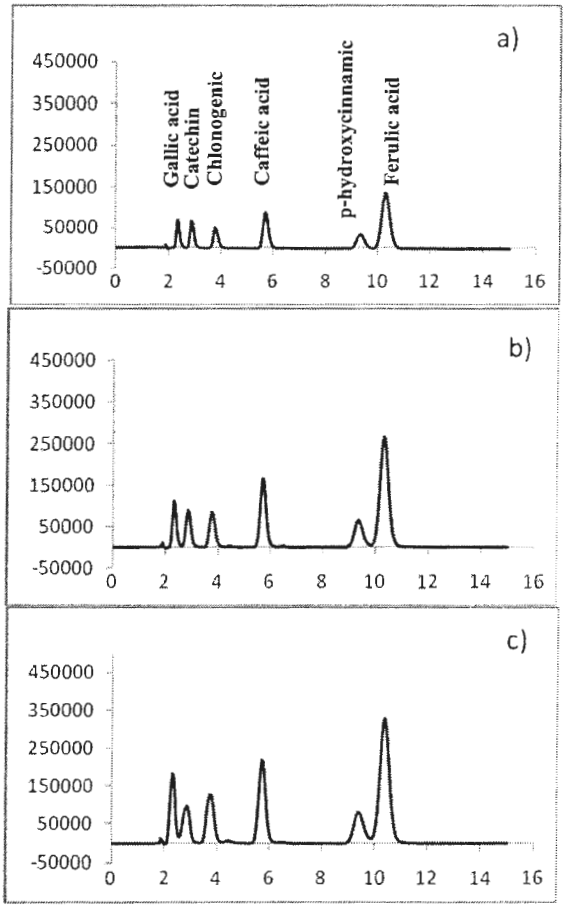
สภาวะที่เหมาะสมในการแยกด้วยเทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีแสดงดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** สภาวะที่เหมาะสมในการแยกด้วยเทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

| **Optimum conditions** | |
|---|---|
| Column | ODS: 4.6 x 150 mm , particle size 5 µm |
| Flow-rate | 1.0 mL/min |
| Temperature (column) | 26 °C |
| Injection sample | 20 µL |
| Mobile phase | 2 mM $H_3PO_4$ in ethanol 25% |
| Detector | Photodiode Array (PDA):<br>ความยาวคลื่น= 280 nm |

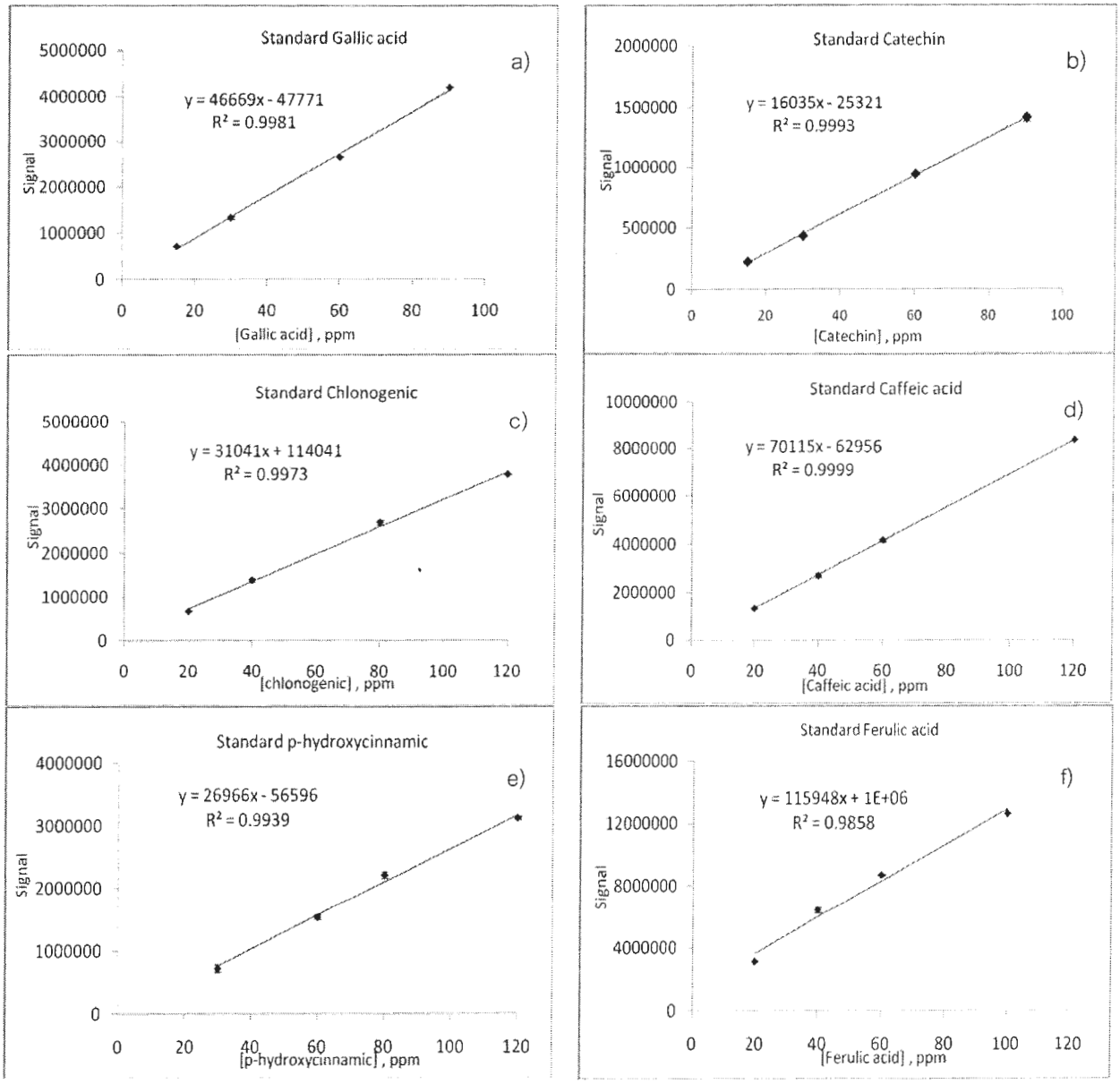
## กราฟมาตรฐาน (Calibration curves)

ที่สภาวะที่เหมาะสมในการแยกด้วยเทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานสารต้านอนุมูลอิสระผสม 6 ชนิด (Gallic acid, Catechin, Chlorogenic, Caffeic acid, p-hydroxycinnamic และ Ferulic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 18




**<u>รูปที่ 18</u>** โครมาโทแกรมของสารละลายสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานผสมทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Gallic acid, Catechin, Chlorogenic, Caffeic acid, p-hydroxycinnamic และ Ferulic acid ที่ความเข้มข้น a) 15, 15, 20, 20, 30 และ 20 ppm , b) 30, 30, 40, 40, 60 และ 40 ppm , c) 60, 60, 80, 60, 80 และ 60 ppm ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด DAD

จากโครมาโทแกรมเมื่อนำความสูงของสัญญาณที่ได้และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้มาสร้างกราฟมาตรฐานจะได้กราฟแสดงดังรูปที่ 19




**<u>รูปที่ 19</u>** กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ a) Gallic acid, b) Catechin, c) Chlonogenic d) Caffeic acid, e) p-hydroxycinnamic และ f) Ferulic acid

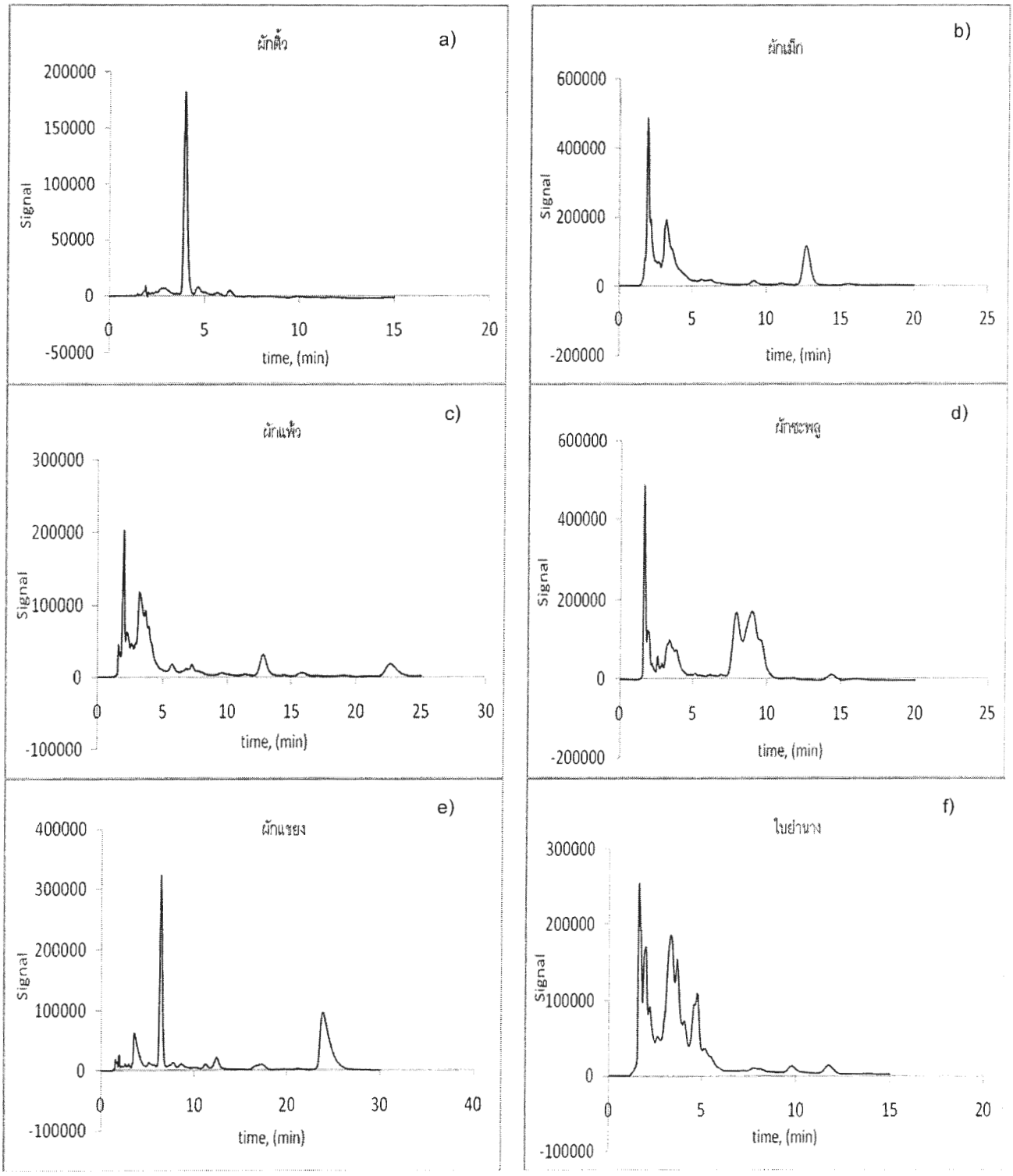
ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีตัวตรวจวัดแบบ DAD ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Gallic acid, Catechin, Chlorogenic, Caffeic acid, p-hydroxycinnamic และ Ferulic acid สรุปได้ดังตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีตัวตรวจวัดแบบ DAD ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Gallic acid, Catechin, Chlorogenic, Caffeic acid, p-hydroxycinnamic และ Ferulic acid

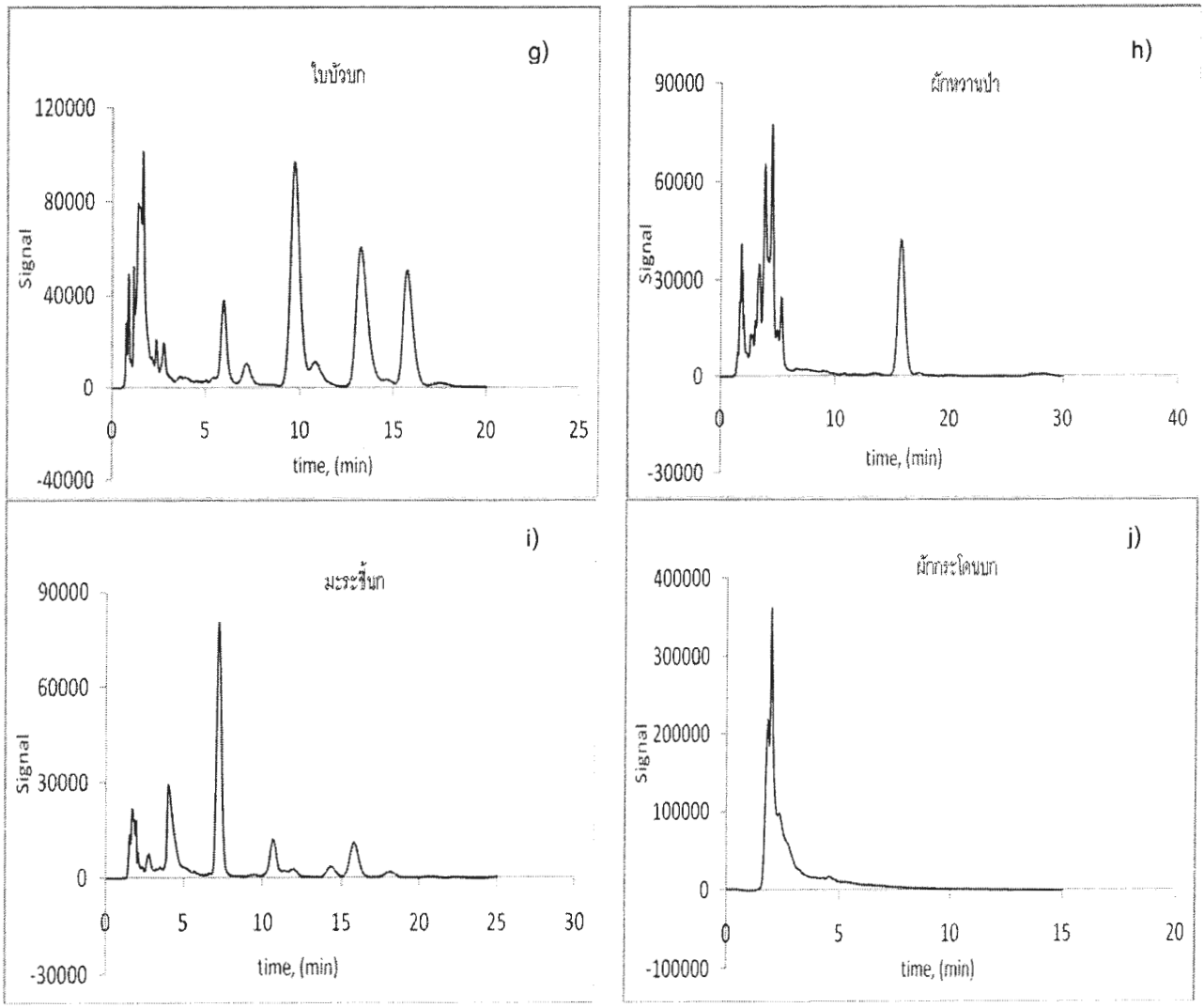
| Antioxidants | Linear range | Equations | $r^2$ |
|---|---|---|---|
| Gallic acid | 25-90 | y = 46669x - 47771 | 0.9981 |
| Catechin | 15-90 | y = 16035x - 25321 | 0.9993 |
| Chlonogenic | 20-120 | y = 31041x + 114041 | 0.9973 |
| Caffeic acid | 20-120 | y = 70115x - 62956 | 0.9999 |
| p-hydroxycinnamic | 30-120 | y = 26966x - 56596 | 0.9939 |
| Ferulic acid | 20-120 | y = 115948x + 1E+06 | 0.9858 |

**การวิเคราะห์วิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารตัวอย่าง**

ในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารตัวอย่างในตัวอย่างสารสกัดจากพืชและสมุนไพร ตัวอย่างที่นำมาทำการวิเคราะห์ 10 ชนิดได้แก่ผักติ้ว, ผักเม็ก, ผักแพ้ว, ผักชะพลู, ผักแขยง, ใบย่านาง, ใบบัวบก, ผักหวานป่า, มะระขี้นก และ ผักกระโดนบก โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 20




**<u>รูปที่ 20</u>** ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดจากพืชและสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ a) ผักติ้ว, b) ผักเม็ก, c) ผักแพ้ว, d) ผักชะพลู, e) ผักแขยง, f) ใบย่านาง, g) ใบบัวบก, h) ผักหวานป่า, i) มะระขี้นก และ j) ผักกระโดนบก




**<u>รูปที่ 20</u>** (ต่อ) ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดจากพืชและสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ a) ผักติ้ว, b) ผักเม็ก, c) ผักแพ้ว, d) ผักชะพลู, e) ผักแขยง, f) ใบย่านาง, g) ใบบัวบก, h) ผักหวานป่า, i) มะระขี้นก และ j) ผักกระโดนบก

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจะใช้เทคนิคในการ spike สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานลงไปสารตัวอย่างเพื่อช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในสารตัวอย่างเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใด ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบในสารสกัดพืชและสมุนไพรตัวอย่างทั้ง 10 ชนิด สรุปดังตารางที่ 7

**ตารางที่ 7** ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบในสารสกัดพืชและสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ผักติ้ว, ผักเม็ก, ผักแพ้ว, ผักชะพลู, ผักแขยง, ใบย่านาง, ใบบัวบก, ผักหวานป่า, มะระขี้นก และ ผักกระโดนบก

| พืชสมุนไพร | ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่พบ (µg/g) ± S.D. (n=3) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Gallic acid | Catechin | Chlorogenic | Caffeic acid | p-hydrocinnamic | Ferulic acid |
| ผักติ้ว | - | 113.7 ± 9.3 | 611.9 ± 7.4 | - | - | - |
| ผักเม็ก | - | 45.9 ± 1.2 | - | - | - | - |
| ผักแพ้ว | 1.0 ± 0.2 | 12.9 ± 0.4 | 16.6 ± 0.7 | - | - | - |
| ผักชะพล | - | 59.4 ± 2.6 | - | - | 143.4 ± 2.8 | - |
| ผักแขยง | 7.3 ± 0.9 | 41.7 ± 1.0 | 58.5 ± 0.7 | - | - | - |
| ผักใบย่านาง | 13.1 ± 1.6 | 21.8 ± 1.2 | 34.9 ± 0.9 | - | - | - |
| ผักใบบัวบก | - | 75.0 ± 1.5 | 34.0 ± 1.2 | - | - | - |
| ผักหวานป่า | 6.4 ± 1.1 | 21.4 ± 1.2 | 74.2 ± 1.1 | 13.6 ± 0.6 | - | - |
| ผักมะระขี้นก | - | 23.7 ± 1.6 | 55.5 ± 1.7 | - | - | 11.4 ± 1.0 |
| ผักกระโดนบก | 719.0 ± 0.2 | - | - | - | - | - |

ในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารตัวอย่าง ในตัวอย่างสารสกัดจากพืชและสมุนไพรด้วยเทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่ใช้การตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด PDA ผลการทดลองจากตารางที่ 7 พบว่าผักและสมุนไพรที่นำมาตรวจสอบส่วนใหญ่จะมีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระชนิด Gallic acid, Catechin และ Chlonogenic แสดงให้เห็นว่า สารต้านอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดนี้เป็นองค์ประกอบในผักพื้นบ้านทั่วไป โดยเฉพาะ Catechin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดฟลาโวนอยด์ที่พบมากในชา หรือชาเขียว [18] พบในพืชสมุนไพรที่นำมาทดสอบเกือบทุกชนิดยกเว้นผักกระโดนบก ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของ Cinnamic acid เช่น Caffeic acid จะพบเฉพาะในผักหวานป่า p-hydrocinnamic พบเฉพาะในชะพลู และ Ferulic acid พบเฉพาะในมะระขี้นกตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในตัวอย่างผักและพืชสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ผักกระโดนและผักติ้วมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูง (2 ลำดับแรก) โดยผักติ้ว มีปริมาณของ Catechin 113.7 ± 9.3 และ Chlonogenic เท่ากับ 611.9 ± 7.4 ส่วนผักกระโดนบกมีปริมาณของ Gallic acid เท่ากับ 719.0 ± 0.2 ตามลำดับ ผลการทดลองจากปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในผักติ้วสอดคล้องกับผลการศึกษา [12,13] ซึ่งรายงานว่าสารประกอบฟีโนลิกส์หลักที่พบในผักติ้วคือ chlorogenic acid ผลลัพธ์วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสรที่พบในสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ที่ได้จากการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าได้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกรับประทานผักและสมุนไพรเหล่านี้ให้เหมาะสมตามความต้องการได้

## 4. บทสรุป

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total Antioxidant Capacity; TAC) โดยอาศัยการวัดปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ดัดแปรด้วยคาร์บอนนาโนทิวบ์ (GC/CNT) ในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจะวัดด้วยเทคนิคแอมเพอร์โรเมทรีจะติดตามปริมาณของสารอนุมูลอิสระ (DPPH) ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ การวัดปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจึงวัดได้จากการลดลงของสัญญาณจาก DPPH ผลการทดลองจากไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารอนุมูลอิสระ DPPH และสารต้านอนุมูลอิสระที่สนใจเช่น catechin, quercetin, gallic acid และ caffeic acid พบว่าไซคลิกโวลแทมโมแกรมที่ได้จากทั้งขั้วไฟฟ้า GC และ GC/CNT ให้พีคออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระที่สนใจที่ชัดเจน แต่ในขั้วไฟฟ้า GC/CNT มีสภาพไวที่สูงกว่าในขั้วไฟฟ้า GC ธรรมดา (ประมาณ 8-30 เท่า) ได้นำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคโฟลอินเจคชันอะนาลิซิสเพื่อใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAC) ผลการทดลองพบว่าเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นให้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงในช่วงที่กว้างในสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบ โดยมีขีดจำกัดในการวิเคราะห์ในระดับที่ต่ำถึงไมโครโมลาร์ ในการประยุกต์เทคนิควิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรจำนวน 6 ชนิด (ผักกระโดน, ผักอีหลำ, ผักแขยง, ผักเม็ก, ผักแพ้ว และผักติ้ว) พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับเทคนิคมาตรฐานวิธี DPPH

ในการทดลองตรวจประเมินความสามารถสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ (Total phenolic content) ในสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรจำนวน 11 ชนิดในเขตจังหวัดอุบลราชธานีโดยใช้เทคนิคมาตรฐานวิธี DPPH, ABTS และ Folin-Cioculteau ผลการทดลองด้วยวิธี ABTS พบว่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของพืชสมุนไพรเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดน > ผักเม็ก > ผักติ้ว > ผักแพ้ว > ใบย่านาง > ผักแขยง > ดอกผักติ้ว > มะระขี้นก ~ ใบผักหวานป่า > บัวบก > ผักชะพลู ส่วนความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในผักและสมุนไพรจากวิธี DPPH เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก >

ผักเม็ก > ผักติ้ว > ผักแพ้ว > ผักแขยง > ดอกผักติ้ว > ใบย่านาง > มะระขี้นก > บัวบก~ ใบผักหวานป่า~ ผักชะพลู ปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี Folin-Ciocalteau เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก > ผักติ้ว > ผักเม็ก > ผักแพ้ว > ผักแขยง > ดอกผักติ้ว> ใบย่านาง > มะระขี้นก ~ ผักชะพลู > บัวบก > ใบผักหวานป่า โดยผักและสมุนไพรที่พบว่ามีสารประกอบฟีโนลิกส์สูงมักมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมด้วย

การนำเทคนิคตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ขั้วไฟฟ้า GC/CNT มาใช้เป็นตัวตรวจวัดในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระหลังจากแยกด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากเกิดการเจือจางของสารต้านอนุมูลอิสระจากเฟสเคลื่อนที่ ทำให้สภาพไวที่ได้จากการวิเคราะห์ยังไม่ดีนักเมื่อเทียบกับตัวตรวจวัดชนิด photodiode array (PDA) ในการวิเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงเลือกใช้ตัวตรวจวัดชนิด PDA ผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบเบื้องต้นทางด้านโภชนาการสำหรับผู้บริโภคในการเลือกรับประทานผักสมุนไพรที่มีอยู่ในท้องถิ่นชนิดต่าง ๆ เพื่อรักษาสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ และได้รับคุณค่าทางโภชนาการสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

[1] Mittler, R., *Trends Plant Sci.,*7 (2002) 405-410.

[2] Zulueta, A., Esteve, M. J., Frasquet, I., & Frigola, A.,*Food Chem.,* 103 (2007) 1365-1374.

[3] Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L., *J. Agric. Food Chem.*, *44* (2007) 701-705.

[4] Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., *Clin. Sci.* 84 (1993) 407-412.

[5] Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., *LWT-Food Sci. Technol.* 28 (1995), 25-30.

[6] โอภา วัชระคุปต์, *สารต้านอนุมูลอิสระ RADICAL SCAVENGING AGENT*. (2550) กรุงเทพ :นิวไทยมิตรการพิมพ์.

[7] Cowan, M. M., *Clinical microbiology* 12 (1999) 564-582.

[8] วาริน แสงกิตติโกมล, *วารสารสหเวชศาสตร์* 3 (2546) 91-99.

[9] Shahidi, F. and Wanasundara, P.K.J., *Crit Rev Food Sci Nutr.* 32 (1992) 67-103.

[10] Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L., *J. Agric. Food Chem.,* 535 (2005) 1856-1841.

[11] Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., & Boas, L. V., *Food Sci. Technol. Int. (London, U. K.)*, 12 (2006) 385-395.

[12] Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M. H., *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 2719-2725

[13] Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M. H., . *Food Chemistry*, 100 (2007) 1620-1629.

[14] Kaur, C. and Kapoor, H.C., *Int. J. of Food Sci. and Tech.* 37 (2002) 153-161.

[15] Thaipoong, K., Boonprakob, U., Zevallos, L.S. and Byrne, D, *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 36 (2005) 254-257.

[16] นันท์นภัส เดิมวงศ์, *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์* 8 (2551) 41-48.

[17] Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M.H. *Food Chemistry*, 100;4 (2007) 1620-1629.

[18] Wang, H., Helliwell, K. and You, X. *Food Chemistry*, 68 (2000) 115-121.

## Output ของโครงการ

### 1 Output ของโครงการในเรื่องของการตีพิมพ์สรุปได้ดังต่อไปนี้

1) มะลิวรรณ อมตชงไชย "วิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมอย่างรวดเร็ว" วารสารวิชาการ ม.อบ. ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 หน้า 49-59.
2) มะลิวรรณ อมตชงไชย, เสาวนีย์ เหล่าสิงห์ และสมภพ มรดา"การประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกส์ในตัวอย่างผกและพืชสมุนไพรในจังหวัดอุบลราชธานี" เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการม.อบ. วิจัย ครั้งที่ 3 หน้า 364 -372
3) **M. Amatatongchai**, S. Laosing, Y. Sakuldech, S. Angkaew, O. Chailapakul and D. Nacapricha "New Method for evaluation of total antioxidant capacity based on flow injection with amperometric detection of free radical reaction" Proceeding of Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2008), Bangkok, Thailand.

### 2 Output ของโครงการในเรื่องของผลการวิจัยสรุปได้ดังต่อไปนี้

1) ได้ระบบที่เป็นระบบวิเคราะห์แบบ flow injection (FI) ที่มีการตรวจวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับใช้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม ซึ่งเหมาะสมที่จะใช้สำหรับตรวจหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในผักและพืชสมุนไพร ระบบที่พัฒนาได้พัฒนาขึ้นมีความรวดเร็ว และให้ความแม่นยำที่ดีกว่าวิธีเดิมที่ใช้กันในปัจจุบัน เพราะสามารถควบคุมความแม่นยำของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระได้ ทำให้มีความแม่นยำของการวัด และมีความสะดวกกับผู้ใช้มากกว่าวิธีเดิมมาก และให้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือโดยเมื่อนำมาเทียบกับเทคนิคที่เป็นเทคนิคมาตรฐานอื่น ๆ เช่น spectrometry พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2) ได้วิธี สำหรับใช้ในวิเคราะห์เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเหมาะสมที่จะใช้สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในพืช หรือตรวจสอบสารหาสารที่มีฤทธิ์หรือสรรพคุณทางยา เช่นสารจำพวก bioactive compounds

3) ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการบ่งชี้ว่าสมุนไพรชนิดใดในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระสูง และพืชสมุนไพรชนิดใดบ้างที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ปรุงอาหารหรือนำไปบริโภคเพื่อเป็นอาหารสุขภาพ

4) โครงการวิจัยนี้ได้เอื้อให้มีการผลิตมหาบัณฑิต ทางด้านเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมจำนวน 1 คน และเคมี จำนวน 1 คน

5) มีเครือข่ายความร่วมมือระหว่างหน่วยงานของราชการ มหาวิทยาลัย (มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีและมหาวิทยาลัยมหิดล)

# ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**

**ตาราง ก-1** Common name and botanical name of Thai culinary plant extract samples used in Section 1.

| Sample code | Common name | Botanical name | Picture |
|---|---|---|---|
| **G** | Tummy wood, กระโดน | *Careya sphaerica* Roxb. | |
| **H** | Red head tree, Red-bead tree, อีหลำ | *Adenanthera pavonina* Linn. | |
| **K** | Rice Paddy Herb, Finger grass, แขยง | *Limnophila aromatica* Merr. | |
| **M** | Metchun, เม็ก | *Syzygium gratum*(Wright)S.N. | |
| **P** | Smartweed, Laksa plant, Vietnamese mint, แพ้ว | *Polygonum odoratum* Lour. | |
| **T** | Teaw, ติ้ว | *Cratoxylum formosum* Dyer | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **B – 01: บัวบก** (*Tiger Herbal Centella asiatica* (Linn.) Urban) | **G – 01: ผักกระโดนบก** (*Careya sphaerica* Roxb.) | **K – 01: ผักแขยง** (*Limnophila aromatica* Merr.) | **S – 01: ผักชะพลู** (*Piper sarmentosum* Roxb) |
| **M – 01: ผักเม็ก** (*Syzygium gratum* (Wight) S.N.) | **M – 02: มะระขี้นก** (*Momordica charantia* L.) | **P – 01: ผักแพ้ว** (*Polygonum odoratum* Lour.) | **T – 01: ผักเหี้ยว** (*Cratoxylum formosum* Dyer) |
| **W – 01: ใบผักหวานป่า** (*Melientha suavis* Pierre) | **Y – 01: ใบย่านาง** (*Tiliacora triandra* Diels) | **T – 02: ดอกผักเหี้ยว** (*Cratoxylum formosum* Dyer **(flower)** | |

**<u>รูป ก-1</u>** ชื่อท้องถิ่น และชื่อวิทยาศาสตร์ของผักพื้นบ้านจำนวน 11 ชนิดที่นำมาตรวจประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม - สิงหาคม 2553
ISSN 1685 7941
วารสารวิชาการ
มจร.
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี JOURNAL OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

วารสารวิชาการ มอบ.ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม – สิงหาคม 2553 

# วิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมอย่างรวดเร็ว

# Flow Injection Based Method for High Throughput Screening of Total Antioxidant Capacity

**มะลิวรรณ อมตธงไชย**

ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (FIRST Labs)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

**บทคัดย่อ**

การพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidant capacity; TAC) เพื่อใช้ในการคัดเลือกพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ หรือใช้เป็นเครื่องมือในการทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางยา ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระหรือใช้ออกซิไดซิงรีเอเจนต์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ หรือ $DPPH^{\bullet}$ ส่วนสารออกซิไดซิงรีเอเจนต์ที่ใช้คือ Folin-Ciocalteau reagent (FCR) การวิเคราะห์ค่า TAC โดยการทดลองแบบดั้งเดิมโดยวิธีแบทช์มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลานาน ใช้ปริมาณสารตัวอย่าง/รีเอเจนต์มาก และการควบคุมเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารให้คงที่และเท่ากันทุกๆ ครั้งทำได้ยาก เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อให้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารน้อย สะดวกและเหมาะสมกับการวิเคราะห์ปริมาณ TAC ในตัวอย่างชนิดต่างๆ บทความนี้จะเปรียบเทียบถึงข้อดีและข้อเสียของเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลวิธีต่างๆ ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่า TAC อย่างรวดเร็วเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิม เช่น วิธีวิเคราะห์ที่ใช้สารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ (FI/$ABTS^{\bullet+}$) หรือ $DPPH^{\bullet}$ (FI/$DPPH^{\bullet}$ และ SIA/$DPPH^{\bullet}$) ใช้ปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนต์ของ luminol-Co(II)/EDTA กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (FI/CL) และใช้ปฏิกิริยาของ FCR (MSFIA/FCR)

**คำสำคัญ:** สารต้านอนุมูลอิสระ โฟลอินเจคชัน เทคนิควิเคราะห์ที่รู้ผลเร็ว

**Abstract**

The development of methods for evaluation of total antioxidant capacity in plants as a source of natural antioxidants, bioactive compounds used in pharmaceutical industries, and drug discovery is an increasing area of research. Generally, total antioxidant capacity is evaluated by measuring the radical scavenging or reducing capacity of the samples against the selected radical or oxidizing reagents. The reagents are non-biological radicals such as $ABTS^{\bullet+}$ or $DPPH^{\bullet}$ and oxidants such as Folin-Ciocalteau reagent. Drawbacks of the application of batch methodologies for research task and/or routine analysis are that they are time-consuming, use large volumes of reagent/sample, and it is difficult to control the reaction time. Implementation of automatic analytical methodologies based on flow analysis methods presented several advantages, such as simplicity, versatility, reduced sample/reagent consumption, and low cost. Moreover, owing to their reproducible and precise timing, the flow based methods were able to provide high sample throughput and reliable determination of total antioxidant capacity. In this review, a critical comparison between the different automatic flow based systems developed for high throughput screening of total antioxidant capacity and the advantages of automatic methods towards the corresponding batch procedure were established. Several flow

injection methods based on scavenging of $ABTS^{\bullet+}$ (FI/$ABTS^{\bullet+}$) or $DPPH^{\bullet}$ (FI/$DPPH^{\bullet}$ and SIA/$DPPH^{\bullet}$), using chemiluminescence reaction of luminol-Co(II)/EDTA and $H_2O_2$ (FI/CL), and FCR (MSFIA/FCR), were reviewed.

**Keywords:** Antioxidant, Flow injection, Throughput screening

## 1. บทนำ

### 1.1 บทบาทและแหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

*ความหมาย*

**อนุมูลอิสระ (Oxidants)** คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายจะทำให้เซลล์ต่างๆ ถูกทำลาย อนุมูลอิสระมาจากทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกร่างกาย ภายในเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ซึ่งจะมีการสร้างสารอนุมูลอิสระจำพวก reactive oxygen species (ROS) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ไฮดรอกซิลแรดิคัล ($HO^{\bullet}$) เปอร์ออกซิลแรดิคัล ($ROO^{\bullet}$) และซูเปอร์ออกไซด์แรดิคัล ($O_2^{\bullet-}$) ขึ้นมาผ่านกระบวนการหายใจ นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดขึ้นได้จากการได้รับสารพิษ สารเคมีจากสิ่งแวดล้อม ยาบางชนิดและรังสี

**สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)** เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป เป็นศัพท์ที่แปลมาจากคำว่า antiradical ปัจจุบันได้ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล (radical scavenger) เพื่อให้ตรงกับหน้าที่การทำงาน และอาจใช้คำว่า "สารแอนตี้ออกซิแดนซ์" แทน อย่างไรก็ตามในภาษาไทยยังคงใช้คำว่าสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ (โอภา วัชระคุปต์, 2550)

### 1.2 ความสำคัญในการประเมินปริมาณสารอนุมูลอิสระและวิธีการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัวจึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ของร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นไขมัน โคเลสเตอรอล กรดไขมันไม่อิ่มตัว โปรตีน และสารพันธุกรรมของร่างกาย จึงทำให้โครงสร้างและบทบาทการทำงานของสารชีวโมเลกุลนี้มีความผิดปกติไป และสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องจากสารชีวโมเลกุลหนึ่งไปยังสารชีวโมเลกุลอื่นจนเกิดอนุพันธ์ใหม่เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ทำให้เกิดสภาวะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ อาจถูกทำลายได้ในที่สุด ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอ และทำให้มีการสร้างยีนที่ผิดปกติอาจทำให้กลายเป็นเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular) อัลไซม์เมอร์ (Alzheimer's disease) พาร์คินสัน (Parkinson's disease) หรือแม้แต่การแก่ก่อนวัย (aging) (Halliwell and Gutteridge, 1998; ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์, 2538)

ในคนปกติร่างกายจะมีระบบสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลุ่มของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ catalase เป็นต้น และกลุ่ม metal-binding protein ได้แก่ feritin, ceruloplamin, transferrin และ uric acid (Halliwell and Gutteridge, 1998) เพื่อรักษาระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับสมดุล แต่ถ้าในสภาวะที่ระดับของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระไม่อยู่ในระดับสมดุล คือมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ สภาวะเช่นนี้เรียกว่าเกิด "สภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress)" ซึ่งการมีอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องที่เป็นผลิตผลของสารอนุมูลอิสระที่มีความไวและอันตรายสูงมากเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะต้านทานไว้ได้ จะก่อให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล (ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและสารพันธุกรรม) เป็นอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ (Mittler, 2002; โอภา วัชระคุปต์, 2550)

นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังสามารถพบได้ในผัก ผลไม้ และสมุนไพร ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และวิตามินชนิดต่างๆ สารในกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, anthocyanins, carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid (Zulueta et al., 2007) สารในกลุ่มนี้เป็นสารที่ให้สีสันแก่พืช ผัก และผลไม้ เช่น สาร anthocyanins พบในผลเชอร์รี่ทำให้มีสีแดง ผลองุ่นและดอกอัญชันทำให้มีสีม่วง สาร carotenoids พบในแครอท ฟักทอง และมะละกอทำให้มีสีส้ม หรือเหลือง สารเหล่านี้พบในปริมาณมากบ้างน้อย

วารสารวิชาการ มอบ.ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม – สิงหาคม 2553 51

บ้างขึ้นอยู่กับชนิด แหล่งที่เพาะปลูก และส่วนต่างๆ ของพืช สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สรรพคุณทางยาคือ ลดการอักเสบ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านโรคภูมิแพ้ และมะเร็ง (โอภา วัชระคุปต์, 2550; Shahidi and Wanasundara, 1992; Garcia-Alonso et al., 2004) สารต้านอนุมูลอิสระอีกชนิดที่พบในผัก ผลไม้ และสมุนไพรได้แก่ วิตามินชนิดต่างๆ เช่น วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินเอ ($\beta$-carotene) และวิตามินอี ($\alpha$-tocopherol) วิตามินซีเป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้ดี มีสรรพคุณทางยาคือ ช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจน ช่วยในการสลายโคเลสเตอรอล ลดการอักเสบ และต้านมะเร็ง (Genkingger et al., 2004; Wannamethee et al., 2006) ร่างกายไม่สามารถสร้างวิตามินชนิดนี้ได้ จึงจำเป็นต้องได้จากการรับประทานเข้าไป อาหารที่มีวิตามินซีสูง ได้แก่ ผักสด ผลไม้สด ที่มีรสเปรี้ยว

**1.3 ความสำคัญในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ**

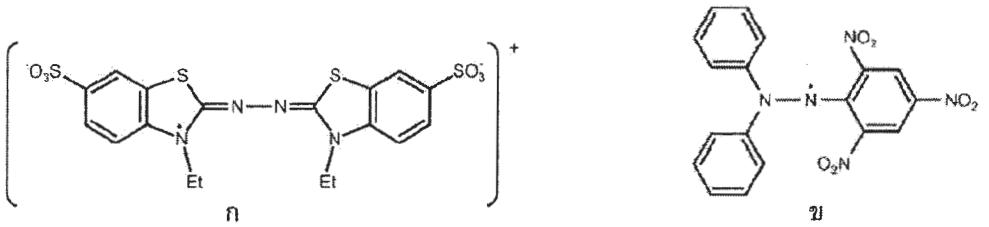
การประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพร ผัก ผลไม้ มีความสำคัญและมีผู้ให้ความสนใจทำการวิจัยเป็นจำนวนมาก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นฐานข้อมูลในการบ่งชี้ว่าสมุนไพรและผลไม้ชนิดใด ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ปรุงอาหารหรือนำไปบริโภคเพื่อเป็นอาหารสุขภาพ การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินเอ หรือสารประกอบฟีนอลิก (Zulueta, et al., 2007) แต่ในความเป็นจริงสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบว่าเป็นสารชนิดใดแน่นอน และสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าคือสารใด ดังนั้นการที่จะประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดและแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยากและไม่จำเป็น เพราะโดยความเป็นจริงแล้วเมื่อมีสารผสมกันหลายชนิดในอาหาร เครื่องดื่ม หรือวิตามิน สิ่งที่ควรสนใจตรวจวัดควรจะเป็นการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด ซึ่งการวัดเป็น TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า (Wang, Cao and Prior, 1996)

การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือก็ได้ สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น สารประกอบกลุ่มเอโซ ABTS$^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) (Miller et al., 1993) ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 1ก หรือ สารอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Brand-williams, Cuvelier and Berset, 1995) รูปที่ 1ข สารอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่ใช่สารที่มีอยู่ในธรรมชาติเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาเลียนแบบอนุมูลอิสระพวก Reactive Oxygen Species (ROS) หรือ Reactive Nitrogen species (RNS) ที่พบในร่างกาย

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีอื่นๆ ในการวิเคราะห์และประเมินค่า TAC อีกโดยใช้ปฏิกิริยาระหว่างออกซิไดซิงรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ เช่น Folin-Ciocalteau reagent หรือ FCR ทั้งในการทดลองแบบดั้งเดิมโดยวิธีแบทช์ (batch method) และมีการพัฒนาให้เป็นระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหล (flow injection method) เพื่อให้การวิเคราะห์มีความสะดวก รวดเร็ว หลักการสำคัญของเทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลคือ มีการแทรกท่อนโซนหรือฉีดสารตัวอย่าง/สารละลายมาตรฐาน หรือรีเอเจนต์ลงในกระแสของสารละลายที่ไหลในท่อเล็กๆ ด้วยอัตราการไหลที่คงที่และอย่างสม่ำเสมอ แล้วมีการตรวจวัดสัญญาณอย่างต่อเนื่องหลังจุดฉีดสาร ส่วนประกอบของเทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลอย่างง่าย คือ ระบบขับเคลื่อนสารละลาย ระบบฉีดสารซึ่งมีวาล์วเป็นส่วนประกอบ ส่วนที่สารเคลื่อนผ่าน และระบบตรวจวัด

บทความนี้จะนำเสนอเทคนิคแบบดั้งเดิมโดยวิธีแบทช์และการประยุกต์ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยการไหล 2 แบบ ได้แก่ flow injection analysis (FIA) และ sequential injection analysis (SIA) ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ เช่น DPPH$^{\bullet}$ หรือ ABTS$^{\bullet+}$ ใช้ปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และใช้ปฏิกิริยาของออกซิไดซิงรี

เอเจนต์ FCR ในการประเมินความสามารถในการรีดิวซ์ โดยรวม




**รูปที่ 1** โครงสร้างของสารอนุมูลอิสระ (ก) ABTS$^{\bullet+}$ [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)] และ (ข) DPPH$^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Magalhaes et al. 2009)

**2. เทคนิควิเคราะห์ในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระ**

**2.1 เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยปฏิกิริยาของสาร DPPH$^{\bullet}$ หรือ ABTS$^{\bullet+}$**

***2.1.1 สารอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$***

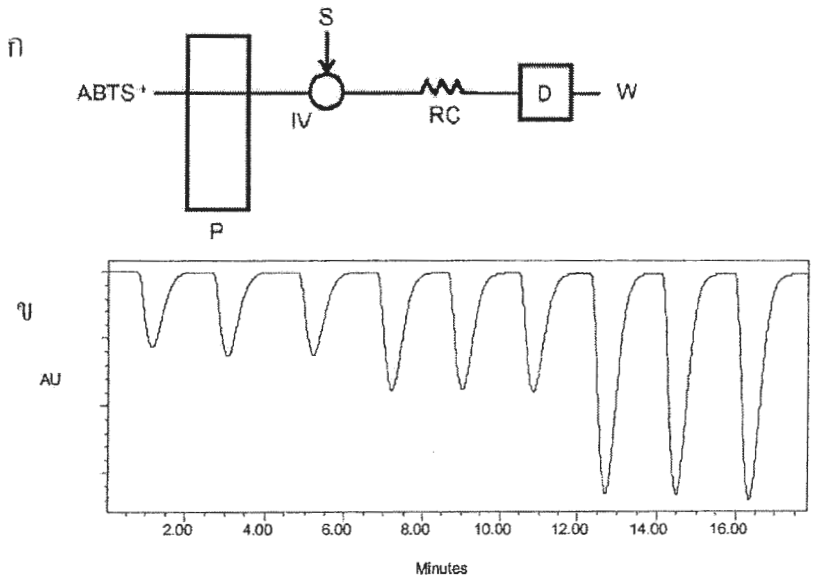
สารที่ใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้สารประกอบกลุ่มเอโซ เช่น 2,2'-azinobis-(3-ethylbonzothiazoline-6-sulphonate ทำให้เกิดอนุมูล ABTS$^{\bullet+}$ ในการวิเคราะห์จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ ABTS$^{\bullet+}$ เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยวิธี ABTS แบบดั้งเดิม ทำได้โดยเตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม นำไปเก็บไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น = 734 นาโนเมตร) อยู่ในช่วง 0.7 (±0.02) ปิเปตสารละลาย ABTS เจือจางปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวต เติมเมทานอลปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ในคิวเวตเก็บไว้ในที่มืด 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ($A_{Control}$) สร้างกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (trolox) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50, 100 และ 200 พีพีเอ็ม) โดยใช้สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์แทนเมทานอล ($A_{Measure}$) คำนวณหาค่า %ABTS radical cation scavenging activity โดยใช้สมการที่ 1 และนำค่า %ABTS radical cation scavenging activity มาพล็อตกับความเข้มข้นของโทรลอกซ์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

$$\%\,ABTS\,radical\;\;cation\;\;scavenging\;\;activity = \left[\frac{A_{Control} - A_{Measure}}{A_{Control}}\right] X100 \qquad (1)$$

การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในสารตัวอย่างทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชตัวอย่างแทนเมทา-นอล คำนวณหาค่า %ABTS radical cation scavenging activity และคำนวณหาความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในหน่วยมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารตัวอย่าง

เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยสารอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ เริ่มพัฒนาขึ้นโดยใช้แมนิโฟลด์แบบช่องเดียว (single channel manifold) (Pellegrini et al., 2003) ดังแสดงในรูปที่ 2 ก

ปั๊ม (P) ของระบบวิเคราะห์จะทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลาย ABTS$^{\bullet+}$ (ละลายในเอทานอล) ให้ไหลผ่านท่อเล็ก ๆ ด้วยอัตราเร็ว 0.8 มิลลิลิตร/นาที ผ่านไปยัง reaction coil (RC) และไปยังตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด UV-VIS spectrophotometer (D) ทำให้ได้สัญญาณของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร อย่างต่อเนื่อง เมื่อมีการฉีดสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระลงในกระแสของสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ ทำให้ปริมาณของสารอนุมูลอิสระในระบบลดลง ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จึงลดลง โดยปริมาณการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงขึ้นกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ฉีดเข้าไป ตัวอย่างของสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระโทรลอกซ์แสดงดังรูปที่ 2 ข




**รูปที่ 2** แผนภาพแสดง (ก) เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยปฏิกริยาของสาร ABTS$^{\bullet+}$ (FI/ABTS$^{\bullet+}$) (Megalhaes et al., 2009) (ข) สัญญาณที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (50,100 และ 200 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) (Pellegrini et al., 2003)

การประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมทำได้โดยการนำค่าความสูงของพีคที่ได้จากการฉีดสารตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระโทรลอกซ์ ปริมาณ TAC จึงรายงานในหน่วยมิลลิโมลาร์ของโทรลอกซ์ (trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC) เมื่อนำระบบที่ได้พัฒนาขึ้นมาใช้ในการทดสอบเพื่อประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระในสารละลายมาตรฐานชนิดต่าง ๆ เช่น gallic acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, naringernin, ascorbic acid และ α-tocopherol พบว่าให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบดั้งเดิม เมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ชา กาแฟ น้ำอัดลม และน้ำผลไม้ พบว่าค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมที่ได้จากเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่ได้จากวิธีแบบดั้งเดิม

การประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ ทำได้ง่าย การวิเคราะห์ทำได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูล ABTS$^{\bullet+}$ ซึ่งทำให้การวิเคราะห์มีความยุ่งยาก

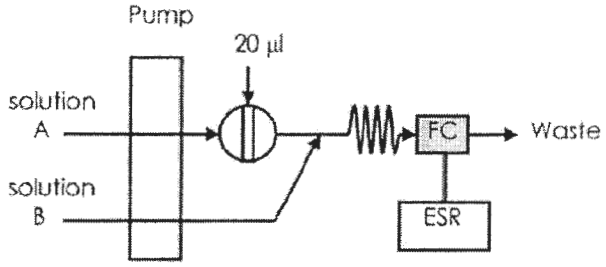
### *2.1.2 สารอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$*

สารอีกตัวที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระคือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเมื่อเตรียมเป็นสารละลายจะมีสีม่วง ในการวิเคราะห์ก็จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีม่วงที่ลดลงเมื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ วิธีในการวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยวิธี DPPH แบบดั้งเดิม ทำได้โดยเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 6.0 X $10^{-5}$ โมลาร์ ปิเปตสารละลาย DPPH ดังกล่าวปริมาตร 2.9 มิลลิลิตรใส่ในคิวเวต เติมเมทานอลปริมาตร 0.10 มิลลิลิตรในคิวเวตเก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ( $A_{CH_3OH}$ ) สร้างกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50, 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม) ใช้สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์แทนเมทานอล ( $A_{std}$ ) คำนวณหาค่า %DPPH scavenging activity โดยใช้ความสัมพันธ์ดังสมการ 2

$$\%DPPH\ \ scavenging\ \ activity\ = (1-\left(\frac{A_{std}}{A_{CH_3OH}}\right)X100 \quad \text{..... (2)}$$

นำค่า %DPPH scavenging activity มาพล็อตกับความเข้มข้นของโทรลอกซ์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในสารตัวอย่างวิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างในทำนองเดียวกัน คำนวณหาค่า %DPPH scavenging activity และความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมในหน่วยมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารตัวอย่าง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยปฏิกริยาของสาร DPPH$^{\bullet}$ เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 2002 โดยใช้ระบบวิเคราะห์แบบ FIA ที่มี electron spin resonance (ESR) spectrophotometer เป็นตัวตรวจวัด (Ukeda, Adachi and Sawamura, 2002) ใช้แมนิโฟลด์แบบสองช่องดังแสดงในรูปที่ 3




**รูปที่ 3** แผนภาพแสดงเทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยปฏิกริยาของสาร DPPH (FI/DPPH$^{\bullet}$) และ electron spin resonance (ESR) spectrophotometer เป็นตัวตรวจวัด เมื่อ solution A = สารละลาย 50% เอทานอล, solution B = สารละลาย DPPH เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ใน 50% เอทานอล, FC = โฟล์วทรูเซลล์ (Ukeda, Adachi and Sawamura, 2002)

สารละลายตัวพา (50% เอทานอล) จะถูกปั๊มอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราเร็ว 0.32 มิลลิลิตร/นาที เข้าไปผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ใน 50% เอทานอล จากนั้นสารละลายผสมจะถูกพาเข้าไปยังโฟล์วทรูเซลล์และถูกตรวจวัดด้วย ESR ที่สนามแม่เหล็ก 335.3 มิลลิเทสลา ได้สัญญาณของอนุมูลอิสระ DPPH อย่างต่อเนื่อง เมื่อฉีดสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (20 ไมโครลิตร) เข้าระบบฉีดสารตัวอย่างผ่านวาวล์ สารต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ DPPH ทำให้ปริมาณของ DPPH ในระบบลดลง สัญญาณหรือพีคที่ได้จึงมีขนาดเล็กลง โดยปริมาณการลดลงของสัญญาณสัมพันธ์กับปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ฉีดเข้าระบบ ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ในตัวอย่างเครื่องดื่มต่างๆ เช่น ชาเขียว ชาอูหลงและกาแฟ ฯลฯ แต่มีข้อเสียคืออัตราเร็วในการวิเคราะห์สารตัวอย่างช้า คือวิเคราะห์ได้เพียง 13 ตัวอย่าง/ชั่วโมง เนื่องจากต้องใช้แรงดันสูงในการผ่านสารละลายไปที่โฟล์วทรูเซลล์ (อัตราเร็วสูงสุดที่ใช้ได้คือ 0.32 มิลลิลิตร/นาที)

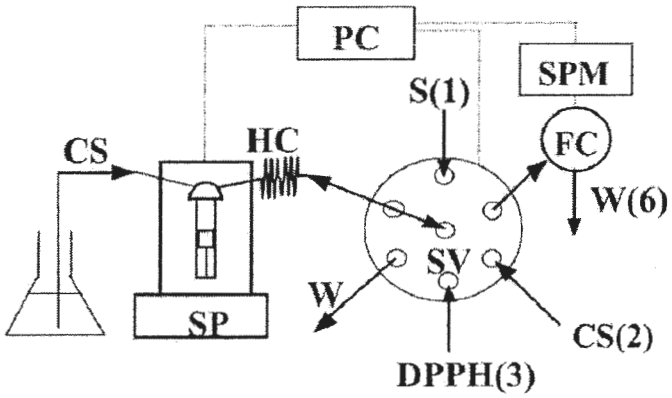
ปี ค.ศ. 2004 การตรวจวัดสเปกโทรโฟโตเมทรีได้ถูกพัฒนามาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระ DPPH ในระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลแบบ SIA เพื่อให้ได้ระบบในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว (Polasek, Skala and Opletal, 2004) แผนภาพของระบบวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 4

ระบบวิเคราะห์แบบ SIA จะใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมไซรินจ์ปั๊มให้ดูดสารละลายที่ต้องการผ่านวาวล์ SC (selector valve) ปริมาตรของสารละลายต่างๆ ค่าที่ต้องการควบคุมด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่และระยะเวลาในการดูดสารละลาย โดยโซนของสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล:น้ำ (1:1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จะถูกประกบทั้งสองข้างด้วยโซนของสารตัวอย่าง (สารตัวอย่างปริมาตรข้างละ 25 ไมโครลิตร) เพื่อช่วยให้เกิดการผสมได้ดียิ่งขึ้น การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสาร DPPH ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ปริมาณการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ฉีดเข้าระบบ ระบบที่

วารสารวิชาการ มอบ.ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม – สิงหาคม 2553 

พัฒนามีอัตราเร็วในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่รวดเร็ว คือ วิเคราะห์ได้ถึง 45 ตัวอย่าง/ชั่วโมง นำมาประยุกต์ใช้ในตัวอย่างสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเห็ด

การประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมด้วยวิธีใช้สารอนุมูลอิสระ DPPH นี้มีข้อดีคือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในร่างกายจริง ๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง (โอภา วัชระคุปต์, 2550) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับข้อจำกัดของการละลายของ DPPH ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ/เอทานอล (Stasko et al., 2007) ว่าถ้ามีน้ำมากกว่า 60% จะเกิดการตกตะกอนของ DPPH ดังนั้นระบบวิเคราะห์ที่ใช้อนุมูลอิสระ DPPH จึงไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้ดี (hydrophilic compounds)




**รูปที่ 4** แผนภาพแสดงเทคนิควิเคราะห์ SIA ที่ใช้ปฏิกิริยาของ DPPH (SIA/DPPH$^{\bullet}$) และสเปกโทรโฟโตเมทรี (SPM) เป็นตัวตรวจวัด เมื่อ SP = ไซรินจ์ปั๊ม, SC = selector valve, FC = โฟล์เซลล์, HC = holding coil, CS(2) = สารละลายตัวพาเอทานอล:น้ำ (1:1) , S(1) = สารตัวอย่าง, DPPH(3) = สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล:น้ำ (1:1), W(6) = waste (Polasek, Skala and Opletal, 2004)

### 2.2 เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ที่อาศัยปฏิกิริยาของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Parejo และคณะ (Parejo et al., 2000) เสนอวิธีการวิเคราะห์ TAC โดยใช้ปฏิกิริยาการเรืองแสงหรือเคมิลูมิเนสเซนต์ระหว่างลูมินอล (luminol) กับอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) การเรืองแสงของลูมินอลจะเกิดได้ดีในสภาวะการทดลองที่เป็นเบส ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการที่ 3 และ 4

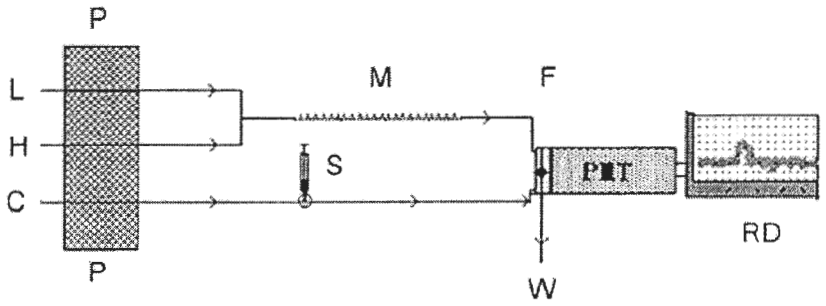
$$Co^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Co^{3+} + OH^{\bullet} + HO^{-} \quad .....(3)$$

$$luminol + OH^{\bullet} \rightarrow light\ (425\ นาโนเมตร) \quad .....(4)$$

ต่อมา Giokas และคณะ (Giokas, Vlessidis and Evmiridis, 2007) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยาดังกล่าวในระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นระบบแบบกึ่งอัตโนมัติทำให้ใช้งานได้ง่ายขึ้นแม้กับผู้ที่ไม่ชำนาญมาก โดยใช้แมนิโฟลด์ ดังแสดงในรูปที่ 5

ปั๊ม (P) ของระบบวิเคราะห์จะทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลาย luminol-Co(II)/EDTA ให้ไหลผ่านท่อเล็กๆ มาบรรจบกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดการผสม

กันที่ขดผสมสำหรับเกิดปฏิกิริยา (M) และไปยังตัวตรวจวัดแสงชนิดโฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์ (PMT) ทำให้ได้สัญญาณของแสงอย่างต่อเนื่อง เมื่อฉีดสารตัวอย่าง/สารละลายมาตรฐานที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลงในกระแสของสารละลายโซเดียมบอเรตบัฟเฟอร์ และให้สารละลายมาบรรจบกับสารละลายผสมของ luminol-Co(II)/EDTA และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิดแสง ทำให้ปริมาณของสารอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในระบบลดลง ความเข้มของแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาจึงลดลง โดยปริมาณการลดลงของแสงขึ้นกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ฉีดเข้าไป การประเมินหาความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม ทำได้โดยการนำค่าความสูงของพีคที่ได้จากการฉีดสารตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมจึงรายงานในหน่วย มิลลิโมลาร์ของโทรลอกซ์




**รูปที่ 5** แผนภาพระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระที่มีระบบตรวจวัดแบบเคมิลูมิเนสเซนต์ (FI/CL) ที่ใช้ปฏิกิริยาระหว่าง luminol-Co(II)/EDTA (L) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H) เมื่อ C คือสารละลายตัวพา (สารละลายโซเดียมบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M, pH 9), M คือ ขดผสมสำหรับเกิดปฏิกิริยา, F แทนโฟล์วเซลล์, S คือระบบฉีดสารตัวอย่าง (100 ไมโครลิตร), PMT คือโฟโตมัลติพลายเออร์ทิวบ์, P คือเพอริสตาลติกปั๊ม, RD คือเรคอร์เดอร์ และ W คือ waste (Giokas , Vlessidis and Evmiridis, 2007)

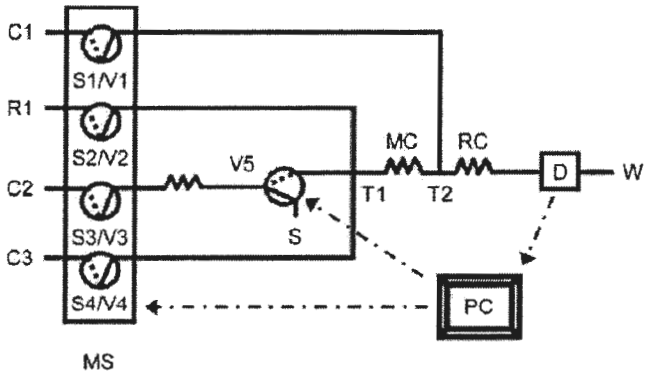
การประเมินหาความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมโดยใช้ปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนต์ระหว่างลูมินอลกับสารอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล มีข้อดีที่เหนือกว่าวิธีอื่นที่กล่าวมาแล้วคือ เนื่องจากสารอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลอิสระที่อันตรายและพบในร่างกายของมนุษย์และมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ผลลัพธ์ของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้มีความน่าเชื่อถือ และใกล้เคียงกับค่าจริง แต่วิธีนี้ต้องอาศัยผู้ทำการทดลองที่ชำนาญ เพราะกระบวนการวัดต้องทำที่เวลาคงที่และเท่ากัน ทุกๆ ครั้ง ซึ่งทำได้ยากและมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดสูง

**2.3 เทคนิควิเคราะห์ที่อาศัยการไหลในการประเมินความสามารถในการรีดิวซ์โดยรวม**

วิธีในการประเมินหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกโดยรวม (total phenolic content) จะใช้ปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารตัวอย่างกับออกซิไดซิงรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ เช่น สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในกรด, ferric reducing antioxidant power (FRAP) radicals assay (Benzie and Strain, 1996), tungstate-molybdate (Folin-Ciocalteau reagent; FCR) และวิธีทางไฟฟ้าเคมีโดยการวัดแบบแอมเพอร์โรเมทรีที่ศักย์ไฟฟ้าค่าหนึ่ง (Mannino et al., 1998) วิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมคือวิธี FCR (Huang, Ou and Prior, 2005) ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่มีสีเหลืองและมีสารประกอบเชิงซ้อนของ heteropoly-phospho-tunstate-molybdates เป็นองค์ประกอบ เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารประกอบในกลุ่มฟีโนลิก FCR จะถูกรีดิวซ์และเลขออกซิเดชันของโมลิบดีนัมจะถูกเปลี่ยนจาก +6 เป็น +5 [$Mo^{+6} + e^- \longrightarrow Mo^{+5}$] ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน ปริมาณของสารประกอบฟีโนลิกในสารตัวอย่างจะแปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีน้ำเงิน (Mo(V)) ที่เกิดขึ้น ในด้านของความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา FCR ในวิธีการประเมินหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกนั้นจะใช้ 7.5% โซเดียมคาร์บอร์เนต ในการปรับสภาพพีเอชให้อยู่ในสภาพ

เบส (pH~10) เพื่อทำให้สภาวะเหมาะสมกับการแตกตัวของสารประกอบพอลิฟีโนลิกเกิดเป็นฟีโนเลตไอออนและสามารถไปรีดิวซ์ FCR ได้ ดังนั้นปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินของโมลิบเดตที่เกิดขึ้นจึงแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ จากกระบวนการดังกล่าว ทำให้วิธีตรวจประเมินมีระดับความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ที่สูงขึ้น

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์แบบอัตโนมัติด้วยสารอนุมูลอิสระโดยใช้ FCR เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 2006 (Magalhaes et al., 2006) โดยใช้ระบบวิเคราะห์แบบ multi-syringe flow injection analysis (MSFIA) และใช้ระบบตรวจวัดแบบสเปคโทรโฟโตเมทรี แผนภาพของระบบวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 6 มัลติไซรินจ์ปั๊ม (multi-syringe; MS) ของระบบวิเคราะห์จะทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (C1) สารละลาย FCR (R1) และสารละลายตัวอย่าง (S) ให้ไหลผ่านท่อเล็กๆ มาบรรจบกันเกิดการผสมกันที่ขดผสมสำหรับเกิดปฏิกิริยา (MC) และเคลื่อนที่ผ่านท่อขด (reaction coil; RC) ที่ยาว 100 เซนติเมตร เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นไซ-รินจ์ปั๊มจะดันท่อนโซนสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาไปยังตัวตรวจวัด (D)




**รูปที่ 6** แผนภาพระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลแบบ multi-syringe flow injection analysis ที่ใช้ปฏิกิริยาของ FCR (MSFIA/FCR), เมื่อ MS คือมัลติไซรินจ์ปั๊ม, Si คือไซรินจ์, Vi แทน commutation valves, MC คือขดผสมสำหรับเกิดปฏิกิริยา, RC คือ ท่อขด (100 cm), D คือตัวตรวจวัด, C1 คือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.25 โมลาร์, C2 คือน้ำ, C3 คือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์, R1 คือ FCR, S คือสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง, PC คือคอมพิวเตอร์ และ W คือ waste (Magalhaes et al., 2006)

ในการปรับสภาพพีเอชของสารละลายให้อยู่ในสภาพเบส ระบบวิเคราะห์นี้ จะใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.25 โมลาร์ (C1) แทนสารละลายโซเดียมคาร์บอร์เนต ซึ่งจะทำให้เกิดข้อดีคือปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น และการใช้ระบบแมนิโฟลด์ที่มีคอมพิวเตอร์ (PC) ในการควบคุมระบบการไหลควบคู่กับมัลติไซรินจ์ปั๊มทำให้การควบคุมเกี่ยวกับระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสาร (reaction time) เป็นไปได้อย่างแม่นยำ ทำให้ปัญหาที่เกิดจากการสลายตัวของสารผลิตภัณฑ์ลดลง ระบบวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีอัตราเร็วในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่รวดเร็ว คือวิเคราะห์ได้ถึง 15 ตัวอย่าง/ชั่วโมง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในตัวอย่างหลายชนิด เช่น ไวน์ เบียร์ และน้ำผลไม้

การประเมินหาความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวมโดยใช้ FCR มีข้อดีที่ที่เหนือกว่าวิธีอื่น คือ เป็นเทคนิคที่ง่าย และมีความเที่ยงสูง จึงเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและใช้เป็นเทคนิคมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิก แต่วิธีนี้มีปัญหาเรื่องการควบคุมเกี่ยวกับระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารที่ต้องคงที่และเท่ากัน ทุกๆ ครั้ง เพื่อให้ผลการทดลองมีความถูกต้อง ซึ่งการควบคุมดังกล่าวหากผู้ทำการทดลองไม่มีความชำนาญจะมีโอกาสในการเกิดข้อผิดพลาดสูง

**3. สรุปและเสนอแนะ**

การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระหรือใช้ออกซิไดซิงรีเอเจนต์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ หรือ $DPPH^{\bullet}$ ในการวิเคราะห์โดยใช้วิธีทดลองแบบดั้งเดิมแบบแบทช์ซึ่งเป็นเทคนิคที่นอกจากจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ใช้ปริมาณสารมากแล้ว การควบคุมเกี่ยวกับระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารให้คงที่และเท่ากันทุกๆ ครั้งทำได้ยาก จึงมีการพัฒนาระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลเพื่อให้การวิเคราะห์มีความสะดวก รวดเร็ว เพื่อใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่รวดเร็วในการคัดเลือกพืชสำหรับใช้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติตัวใหม่ หรือใช้เป็นเครื่องมือในการทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ในการหาสารที่มีสรรพคุณทางยา และทดแทนสารสังเคราะห์ ระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลที่พัฒนาขึ้นเช่น ระบบวิเคราะห์ที่อาศัยปฏิกิริยาของสาร $ABTS^{\bullet+}$ (FI/$ABTS^{\bullet+}$) ระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลที่อาศัยปฏิกิริยาของสาร DPPH (FI/$DPPH^{\bullet}$) ที่มี ESR เป็นตัวตรวจวัด ระบบวิเคราะห์ SIA ที่ใช้สารอนุมูลอิสระ DPPH (SIA/$DPPH^{\bullet}$) และใช้การตรวจวัดแบบสเปกโทรโฟโตเมทรี ระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลที่ใช้ปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนต์ของ luminol-Co(II)/EDTA กับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (FI/CL) และระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหล multi-syringe flow injection analysis ที่อาศัยปฏิกิริยาของ FCR (MSFIA/FCR) ระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลเหล่านี้นอกจากจะช่วยให้การวิเคราะห์หาปริมาณ TAC มีความสะดวก รวดเร็วแล้ว ข้อดีที่เด่นชัดที่สุดของระบบวิเคราะห์ที่อาศัยการไหลหล่านี้คือ สามารถควบคุมระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารให้คงที่และเท่ากัน ทุกๆ ครั้ง ทำให้ผลลัพธ์ที่วิเคราะห์ได้มีความถูกต้อง และมีความเที่ยงสูง

**กิตติกรรมประกาศ**

บทความวิชาการเรื่องนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยในเรื่อง เทคนิคแบบใหม่สำหรับประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

**เอกสารอ้างอิง**

ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์, ประภาศรี ภูวเสถียร และริญ เจริญศิริ. 2538 **โภชนาการและส่งเสริมสุขภาพ.** กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.

โอภา วัชระคุปต์. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ *RADICAL SCAVENGING AGENT*.** กรุงเทพ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.

Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". **LWT-Food Sci. Technol.** 28, 25-30.

Benzie, I. F. F. and Strain J.J. 1996. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay". **Anal. Biochem.** 239, 70-76.

Garcia-Alonso, M., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. 2004. "Evaluation of the antioxidant properties of fruits". **Food Chem.**, 84(1), 13-18.

Giokas, D. L., Vlessidis, A. G., & Evmiridis, N. P.2007. "On-line selective detection of antioxidants free-radical scavenging activity based on Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence by flow injection analysis". **Anal. Chim. Acta**, 589(1), 59-65.

Halliwell, B. and and Gutteridge, J.M.C. 1998. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press: Oxford, UK.

Huang, D.J., Ou, B.X., Prior, R.L. 2005 "The chemistry behind antioxidant capacity assays". **J. of Agric. Food Chem.**, 53, 1841-1856.

Mannino, S., Brenna, O. Buratti, S., Cosio, M. S. (1998). "A new method for the evaluation of the 'Antioxidant Power' of wines". **Electroanalysis** 10, 908-912.

Megalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., Rangel, A.O.S.S. 2006. "Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products of antioxidant

capacity". **J. of Agric. Food Chem.,** 54, 5241-5246.

Megalhaes, L. M., Santos, M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. 2009. "Flow injection based method for fast screening of antioxidant capacity". **Talanta** 77, 1559-1566.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates". **Clin. Sci.** 84, 407-412.

Mittler, R.(2002). "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance". **Trends Plant Sci.**,7(9), 405-410.

Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. Eds. 1999. **Antioxidant food supplements in human health**; Academic Press: London, UK.

Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C., & Kefalas, P. 2000. "Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH$^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay". **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 44(3), 507-512.

Pellegrini, N., Rio, D.D., Colombi, R. 2003. "Application of the 2,2'-Azinobis-(3-ethylbonzothiazoline-6-sulphonate) Radical Cation Assay to a Flow Injection System for the Evaluation of Antioxidant Activity of Some Pure Compounds and Beverages". **J. of Agric. Food Chem.,** 51, 260-264.

Polasek, M., Skala, P., Opletal, L. 2004. "Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection techniques (SIA) using spectrophotometric detection". **Anal. Bioanal. Chem.**,379,754-758.

Shahidi, F. and Wanasundara, P.K.J. 1992. "Phenolic antioxidant". **Crit Rev Food Sci Nutr.** 32: 67-103.

Stasko, A., Brezova, V., Biskupic, S., Misik, V. 2007 "The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents". **Free Radic. Res**, 41(4) 379-390.

Ukeda, H., Adachi, Y., Sawamura, M. 2002. "Flow injection analysis of DPPH radical based on electron spin resonance". **Talanta,** 58, 1279-1283.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. 1996. "Total Antioxidant Capacity of Fruits". **J. Agric. Food Chem.,** 44(3), 701-705.

Wannamethee, S.G., Lowe, G.D., Rumley, A., Bruckdorfer, K. P. and Whin, P.H. (2006) "Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes and markers of imflammation and hemostasis". **Am. J. Clin. Nutr.** 83: 567-574.

Zulueta, A., Esteve, M. J., Frasquet, I., & Frigola, A. 2007. "Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain". **Food Chem.,** 103(4), 1365-1374.

บทคัดย่อ (Abstract)
การประชุมวิชาการ ม.อบ. วิจัย ครั้งที่ 3
Ubon Ratchathani University
การพัฒนาวิถีชีวิตที่ยั่งยืน
ด้วยการวิจัยสหวิทยาการ
28-29 กรกฎาคม 2552
ณ โรงแรมสุนีย์ แกรนด์ แอนด์ คอนเวนชั่น เซ็นเตอร์
The 3rd UBU Research Conference (UBRC 3)
"The Development for Sustainable livelihoods
though Multidisciplinary Research"

364 ประชุมวิชาการ ม.อบ. วิจัย ครั้งที่ 3
28 - 29 กรกฎาคม 2552 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

# การประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกส์ในตัวอย่างผักและพืชสมุนไพรในจังหวัดอุบลราชธานี

# Evaluation of Total Antioxidant Capacity and Phenolic Contents in Vegetables and Herbs in Ubonratchathani Province

มะลิวรรณ อมตชงไชย[1,2*], เสาวนีย์ เหล่าสิงห์[1] และ สมภพ มรดา[1]
[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity; TAC) และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ (Total phenolic content) ในสารสกัดจากผักและพืชสมุนไพรจำนวน 11 ชนิดในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ผลการทดลองพบว่าปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี ABTS เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก (550.40) > ผักเม็ก (512.24) > ผักติ้ว (336.47) > ผักแพ้ว (192.37) > ใบย่านาง (178.40) > ผักแขยง (163.54) > ดอกผักติ้ว (124.48) > มะระขี้นก (116.71) ~ ใบผักหวานป่า (116.49) > บัวบก (103.44) > ผักชะพลู (94.72) มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารตัวอย่าง ส่วนปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและสมุนไพรด้วยวิธี DPPH เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก (463.54) > ผักเม็ก (397.25) > ผักติ้ว (276.52) > ผักแพ้ว (266.94) > ผักแขยง (189.19) > ดอกผักติ้ว(143.24) > ใบย่านาง (114.49) > มะระขี้นก (61.82) > บัวบก (33.63) ~ ใบผักหวานป่า (31.06) ~ ผักชะพลู (30.35) มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารตัวอย่างเมื่อนำผลการทดลองของเทคนิค ABTS และ DPPH มาเปรียบเทียบกันพบว่า ผลลัพธ์วิเคราะห์จากทั้งสองเทคนิคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เมื่อทดสอบด้วย *t*-test ($t_{observed}$ = 2.515, $t_{critical}$ = 3.169) ปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี Folin-Ciocalteau เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก (283.45) > ผักติ้ว (248.96) > ผักเม็ก (211.40) > ผักแพ้ว (160.22) > ผักแขยง (123.37) > ดอกผักติ้ว(119.69) > ใบย่านาง (78.61) > มะระขี้นก (71.74) ~ ผักชะพลู (69.84) > บัวบก (60.83) > ใบผักหวานป่า (56.80) มิลลิกรัมแกลลิคแอซิดต่อกรัมของสารตัวอย่างโดยผักและสมุนไพรที่พบว่ามีสารประกอบฟีโนลิกส์สูงมักมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมด้วย ผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบเบื้องต้นทางด้านโภชนาการสำหรับผู้บริโภคในการเลือกรับประทานผักสมุนไพรที่มีอยู่ในท้องถิ่นชนิดต่างๆ เพื่อรักษาสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ และได้รับคุณค่าทางโภชนาการสูงสุด

คำสำคัญ สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีโนลิกส์ พืชสมุนไพร

## Abstract

This research was carried out to evaluate total antioxidant capacity (TAC) and phenolic contents in 11 indigenous vegetable and herb extracts in Ubonratchathani. Results from ABTS method indicate that *Careya sphaerica* Roxb. has the highest TAC (550.40) followed by *Syzygium gratum* (Wright) S.N. (512.24), *Cratoxylum formosum* Dyer (336.47), *Polygonum odoratum* Lour. (192.37), *Tiliacora triandra* Diels (178.40), *Limnophila aromatica* Merr. (163.54), *Cratoxylum formosum* Dyer (flower) (124.48), *Momordica charantia* L. (116.71), *Melientha suavis* Pierre (116.49), *Tiger Herbal Centella asiatica* (Linn.) Urban (103.44), *Piper sarmentosum* Roxb (94.72) mg of Trolox / g of sample, respectively. The order of TAC values from DPPH method was *Careya sphaerica* Roxb. (463.54) > *Syzygium gratum* (Wright) S.N.

(397.25) > *Cratoxylum formosum* Dyer (276.52) > *Polygonum odoratum* Lour. (266.94) > *Limnophila aromatica* Merr. (189.19) > *Cratoxylum formosum* Dyer (flower) (143.24) > *Tiliacora triandra* Diels (114.49) > *Momordica charantia* L. (61.82) > *Tiger Herbal Centella asiatica* (Linn.) Urban (33.63) ~ *Melientha suavis* Pierre (31.06) ~ *Piper sarmentosum* Roxb (30.35) mg of Trolox / g of sample, respectively. According to the *t*-test, results obtained from ABTS method are not significantly different from DPPH method at 99% confidence ($t_{observed}$ = 2.515, $t_{critical}$ = 3.169). Total phenolic contents were also investigated in the samples by using Folin-Ciocalteau method. The results revealed that the order of total phenolic contents values form this method was *Careya sphaerica* Roxb. (283.45) > *Cratoxylum formosum* Dyer (123.37) > *Syzygium gratum* (Wright) S.N. (211.40) > *Polygonum odoratum* Lour. (160.22) > *Limnophila aromatica* Merr. (123.37) > *Cratoxylum formosum* Dyer (flower) (119.69) > *Tiliacora triandra* Diels (78.61) > *Momordica charantia* L. (71.74) > *Piper sarmentosum* Roxb (69.84) ~ *Tiger Herbal Centella asiatica* (Linn.) Urban (60.83), *Melientha suavis* Pierre (56.80) mg of gallic acid / g of sample. The TAC values corresponded with the total phenolic contents. The TAC values and total phenolic contents from this study can be used as nutrition data for selection to consume the vegetable and herbs extracts containing high levels of antioxidants in order to prevent or to improve the status of imbalance.

**Keywords:** Antioxidant, phenolic content, Herbs

## บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบ ที่มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน การมีอนุมูลอิสระในร่างกายสามารถทำให้เซลล์หลายชนิดถูกทำลาย อาจส่งผลกระทบให้ระบบการทำงานของสารชีวโมเลกุลมีความผิดปกติไป หรือหากเป็นการทำลายโดยเปลี่ยนโครงสร้างของดีเอ็นเอ ทำให้ร่างกายมีการสร้างยีนที่ผิดปกติจนอาจกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระมาได้จากทั้งภายใน และภายนอกร่างกาย โดยภายในเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ (กระบวนการสร้างพลังงาน การเจริญเติบโตของเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการฆ่าเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว และระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์) ส่วนภายนอกอาจได้รับจากสิ่งแวดล้อมในหลายทางอาทิ การสัมผัสกับสารเคมี รังสี ยาบางชนิด มลพิษจากสิ่งแวดล้อม ควันบุหรี่ รวมไปถึงปริมาณแสงแดดที่เกินขนาด ปกติแล้วร่างกายของมนุษย์จะมีการรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมด้วยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ถ้าร่างกายเสียสมดุลโดยมีปริมาณของอนุมูลอิสระมากกว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระอันเนื่องมาจากสาเหตุต่างๆ ดังที่กล่าวมาในข้างต้น ส่งผลให้เป็นที่มาของโรคต่างๆ เช่น การแก่ก่อนวัย โรคหัวใจ เบาหวาน โรคมะเร็ง ฯลฯ ดังนั้นมนุษย์จึงต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมจากภายนอกเช่น การรับประทานอาหารจำพวกผัก ผลไม้ และสมุนไพร ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยรักษาสมดุลระหว่างอนุมูล และสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเหตุนี้สารต้านอนุมูลอิสระจึงได้รับความสนใจจากนักวิจัย นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักโภชนาการ และผู้ที่รักสุขภาพเป็นอย่างมากในปัจจุบัน[1]

การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น Flavonoids, Carotenoids, Vitamin A, C, D, E, Gallic acid หรือสารประกอบฟีโนลิก[2] แต่ในความเป็นจริงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักสมุนไพรหนึ่งๆ มักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ ซึ่งรวมถึงสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าคือสารใด ดังนั้นการที่จะ

ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้างจึงเป็นการยาก และไม่จำเป็นประเด็นที่ควรสนใจตรวจวัดควรจะเป็นการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด การวัด TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า[3]

การวิเคราะห์ค่า TAC โดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง หรือขจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจวัด โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือ สารที่นิยมใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้สารประกอบกลุ่มเอโซ เช่น 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)[4] ทำให้เกิดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เนื่องจากส่งผลดีในการวิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถทำการวิเคราะห์ได้ทั้งในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ สารอีกตัวที่นิยมใช้เช่นกันคือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)[5] การวิเคราะห์สามารถทำในทำนองเดียวกับการวิเคราะห์ $ABTS^{\bullet+}$ แต่เนื่องด้วยอนุมูล DPPH ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในร่างกายจริง ๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ส่งผลให้การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าความเป็นจริง[6]

สารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกส์ ได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, anthocyanins, carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid[7] สารในกลุ่มนี้เป็นสารที่ให้สีสันแก่พืช ผัก ผลไม้ เช่น สาร สาร carotenoids ที่ให้สีส้ม เหลืองในแครอท ฟักทอง มะละกอ และ anthocyanins ที่ให้สีแดงในผลองุ่น สารเหล่านี้พบมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สารต้านอนุมูลอิสระ พวกนี้ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อต่าง ๆและสามารถทนต่อปฏิกิริยา photooxidation ในการสร้างอาหารได้[8] สารประกอบฟีโนลิกส์นอกจากจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด ลดการอักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง ต้านโรคภูมิแพ้ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย[9] วิธีในการประเมินหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์จะใช้ Folin-Ciocalteau Reagent (FCR)[10] ซึ่งเป็น reagent ที่มีสีเหลืองและมีสารประกอบเชิงซ้อนของ heteropolyphosphotunstate-molybdates เป็นองค์ประกอบ เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารประกอบในกลุ่มฟีโนลิกส์ FCR จะถูกรีดิวซ์และโมลิบดีนัมจะถูกเปลี่ยนฟอร์มจากออกซิเดชั่น +6 เป็น +5 [$Mo(VI) + e^- \longrightarrow Mo(V)$] ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน ปริมาณของสารสารประกอบฟีโนลิกส์ในสารตัวอย่างจะแปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีน้ำเงิน (Mo(V)) ที่เกิดขึ้น ในด้านของความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา FCR ในวิธีการประเมินหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกส์นั้นจะใช้ 7.5% $Na_2CO_3$ ในการปรับสภาพพีเอชให้อยู่ในสภาพเบส (pH~10) เพื่อทำให้สภาวะเหมาะสมกับการแตกตัวของสารประกอบโพลีฟีโนลิกส์เกิดเป็นฟีโนเลตไอออนและสามารถไปรีดิวซ์ FCR ได้ ดังนั้นปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินของโมลิบเดตที่เกิดขึ้นจึงแปรผันตรงกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ จากกระบวนการดังกล่าว ทำให้วิธีตรวจประเมินมีระดับความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) ที่สูงขึ้น

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity) และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ (total phenolic content) ในผักและพืชสมุนไพร ที่นิยมบริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกรับประทานผัก และสมุนไพร และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางด้านโภชนาการ

## อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการ

### *1 อุปกรณ์และสารเคมี*

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ การเตรียมตัวอย่างใช้เครื่องเขย่าสาร (Vertex mixer, Labnet International, Inc.) และใช้ Centrifuge (ALC Centrifuge 4218, Milano, Italy) ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสารตัวอย่าง ในการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงใช้เครื่อง spectrophotometer รุ่น Spectronic 23 (Single beam)

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้ Sodium tungstate ($Na_2WO_4.2H_2O$), Sodium molybdate ($Na_2WO_4.2H_2O$), Lithium sulfate ($Li_2SO_4.4H_2O$), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid), 6-hydroxy-2,5,7-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), Sodium carbonate ($Na_2CO_3$), Sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$), Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$), Hexane, Methyl alcohol ($CH_3OH$), Ethyl alcohol ($CH_3CH_2OH$), Hydrochloric acid (HCl) , 85% phosphoric acid

***2 การเตรียมสารเคมี***

สารละลาย DPPH เข้มข้น $6 \times 10^{-5}$ M เตรียมโดยชั่ง DPPH มา 0.0024 g ละลายใน $CH_3OH$ และปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ในขวดวัดปริมาตร

สารละลาย ABTS เข้มข้น 1,000 ppm เตรียมโดยชั่ง ABTS 0.0999 g และ $K_2S_2O_8$ 0.0201 g (200 ppm) ละลายสารทั้งสองด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ในขวดวัดปริมาตร

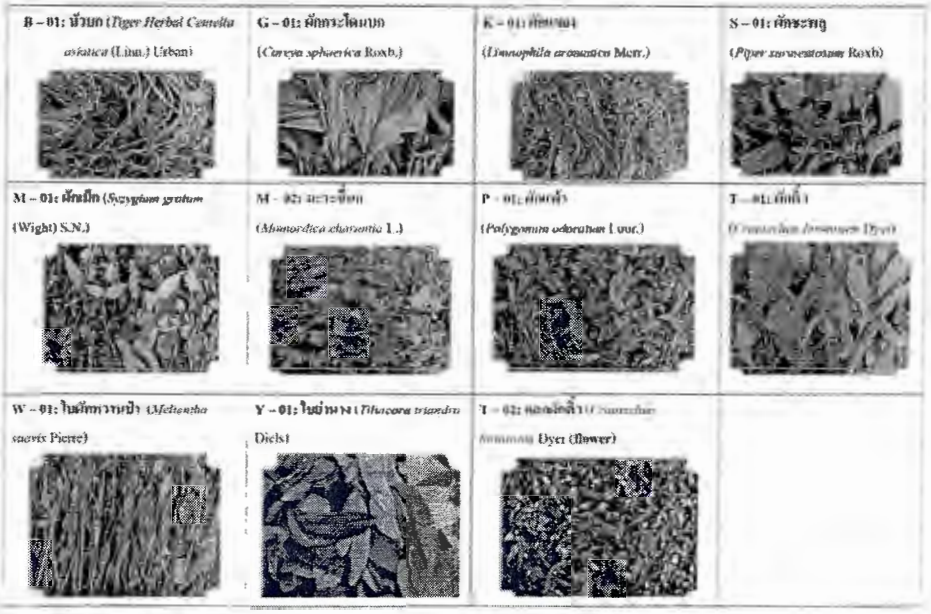
สารละลายมาตรฐาน Trolox และ gallic acid เข้มข้น 1,000 ppm เตรียมโดยชั่ง Trolox หรือ gallic acid 0.0500 g ละลายใน $CH_3OH$ ปรับปริมาตรให้เป็น 50 mL ในขวดวัดปริมาตร

กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid หรือ Trolox (ความเข้มข้น 150 ,100 ,50และ 200 ppm ) เตรียมโดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานของ Gallic acid หรือ Trolox ความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mL ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

Folin-Ciocalteau reagent (FCR) เตรียมโดยการนำ $Na_2WO_4.2H_2O$ 100 g , $Na_2WO_4.2H_2O$ 25 g, กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 100 mL และ กรด phosphoric acid 85% ปริมาตร 50 mL ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2 L เติมน้ำปริมาตร 700 mL ให้ความร้อนจนเดือดนาน 10 ชั่วโมง จากนั้นเติม $Li_2SO_4.4H_2O$ 30 g จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 1L เก็บในภาชนะทึบแสง และเก็บไว้ในที่เย็น

***3 การเตรียมตัวอย่าง***

ผักพื้นบ้านที่ใช้ในงานวิจัยทั้ง 11 ชนิดได้แก่ บัวบก ผักกระโดนบก ผักแขยง ผักชะพลู ผักเม็ก มะระขี้นก ผักแพ้ว ผักติ้วป่า ใบผักหวานป่า ใบย่านาง และดอกผักติ้ว (รูป ชื่อท้องถิ่น และชื่อวิทยาศาสตร์ของผักพื้นบ้านแสดงดังรูปที่ 1)




**รูปที่ 1** ชื่อท้องถิ่น และชื่อวิทยาศาสตร์ของผักพื้นบ้านจำนวน 11 ชนิดที่นำมาตรวจประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

นำผักทั้ง 11 ชนิดมาล้างทำความสะอาดแล้วผึ่งลมให้แห้ง แยกเอาเฉพาะส่วนใบ (และดอกสำหรับดอกผักติ้ว) อบที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 ชั่วโมงด้วยตู้อบลมร้อน จนได้น้ำหนักที่คงที่ นำไปบดหรือปั่นให้ได้ตัวอย่างแห้งที่เป็นเนื้อเดียวกันบรรจุลงในภาชนะที่ปิดมิดชิด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 18°C การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสารตัวอย่างพัฒนาจากวิธีของ S. Silva[11] โดยชั่งตัวอย่างแห้งหนัก 2.5 ± 0.0001 g มาสกัดเพื่อกำจัดเม็ดสี (pigment) และไข (wax) ด้วย เฮกเซนปริมาตร 25.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำกากที่เหลือมาสกัดด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 25.00 mL และ 2% $Na_2S_2O_5$ ปริมาตร 5.00 mL (สกัด 3 ครั้ง) นำชั้นของเหลวที่สกัดได้มารวมกัน จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างในภาชนะสีชาที่มีฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิประมาณ 7°C

*4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่าง*

***วิธี ABTS***

เก็บสารละลาย ABTS เข้มข้น 1,000 ppm ไว้ในที่มืด 16-12ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วย $CH_3CH_2OH$ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 (±0.02) ที่ความยาวคลื่น 734 nm (สารละลาย A)

ปิเปตสารละลาย A ปริมาตร 2.90 mL ใส่ใน cuvette เติม $CH_3OH$ ปริมาตร 0.10 mL ใน cuvette เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ($A_{Control}$)

สร้างกราฟมาตรฐานโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ( ,50 150 ,100และ 200ppm ) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน Trolox แทน $CH_3OH$ ( $A_{Measure}$ ) คำนวณหาค่า %ABTS Radical Cation Scavenging Activity โดยใช้สมการที่ 1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อตระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับค่า %ABTS Radical Cation Scavenging Activity

$$\%ABTS\ Radical\ Cation\ Scavenging\ Activity = \left[\frac{A_{Control} - A_{Measure}}{A_{Control}}\right] x\,100 \qquad (1)$$

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรตัวอย่างแทน $CH_3OH$ คำนวณหาค่า %ABTS Radical Cation Scavenging Activity และปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ mg of Trolox / g of sample

***วิธี DPPH***

ปิเปตสารละลาย DPPH เข้มข้น 6 x $10^{-5}$ M ปริมาตร 2.90 mL ใส่ใน cuvette เติม $CH_3OH$ ปริมาตร 0.10 mL ใน cuvette เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ( $A_{CH_3OH}$ )

สร้างกราฟมาตรฐานโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ( ,50 150 ,100และ 200ppm) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน Trolox แทน $CH_3OH$ ( $A_{std}$ ) คำนวณหาค่า %DPPH Scavenging Activity โดยใช้สมการที่ 2 สร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อตระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับค่า %DPPH Scavenging Activity

$$\%DPPH\ Scavenging\ Activity = \left[1 - (\frac{A_{std}}{A_{CH_3OH}})\right] x\,100 \qquad .. (2)$$

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรตัวอย่างแทน $CH_3OH$ คำนวณหาค่า %DPPH Scavenging Activity และปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ mg of Trolox / g of sample

***วิธี Folin-Cioculteau***

การวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์โดยวิธี Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) ทำได้โดยนำสารละลาย FCR มาเจือจางให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า (สารละลาย B)

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย B ปริมาตร 1.25 mL สารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.25 mL 7.5% $Na_2CO_3$ 1.00 mL และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรตัวอย่างแทนสารละลายมาตรฐาน gallic acid คำนวณหาค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ในรูปของ mg of gallic / g of sample

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

***1 ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS และวิธี DPPH Radical Scavenging Activity***

นำตัวอย่างผักและพืชสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดมา 3 ส่วนเพื่อสกัด (3 replicates) และทำการวิเคราะห์แต่ละ replicate 3 ซ้ำ ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี ABTS และ DPPH แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าผลลัพธ์วิเคราะห์จากการประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS ในผักและสมุนไพร จำนวน 11 ชนิด ในจังหวัดอุบลราชธานี ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่า mean ± S.D. (n = 3)

| รหัสและชนิดพืช | | | ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (mg of Trolox / g of sample) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | วิธี DPPH | วิธี ABTS |
| B | 01 | บัวบก | 33.63 ± 2.54 | 103.44 ± 0.52 |
| G | 01 | ผักกระโดนบก | 463.54 ± 2.70 | 550.40 ± 0.55 |
| K | 01 | ผักแขยง | 189.19 ± 3.13 | 163.54 ± 4.73 |
| M | 01 | ผักเม็ก | 397.25 ± 11.24 | 512.24 ± 17.09 |
| M | 02 | มะระขี้นก | 61.82 ± 1.78 | 116.71 ± 0.93 |
| P | 01 | ผักแพ้ว | 266.94 ± 18.06 | 192.37 ± 5.52 |
| S | 01 | ผักชะพลู | 30.35 ± 0.64 | 94.72 ± 1.59 |
| T | 01 | ผักติ้ว | 276.52 ± 4.61 | 336.47 ± 1.43 |
| T | 02 | ดอกผักติ้ว | 143.24 ± 8.36 | 124.48± 2.59 |
| W | 01 | ใบผักหวานป่า | 31.06 ± 0.90 | 116.49 ± 3.14 |
| Y | 01 | ใบผักย่านาง | 114.49 ± 3.45 | 178.40 ± 9.37 |

ผลการทดลองพบว่าปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี ABTS เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก (550.40) > ผักเม็ก (512.24) > ผักติ้ว (336.47) > ผักแพ้ว (192.37) > ใบย่านาง (178.40) > ผักแขยง (163.54) > ดอกผักติ้ว (124.48) > มะระขี้นก (116.71) ~ ใบผักหวานป่า (116.49) > บัวบก (103.44) > ผักชะพลู (94.72) mg of Trolox / g of sample

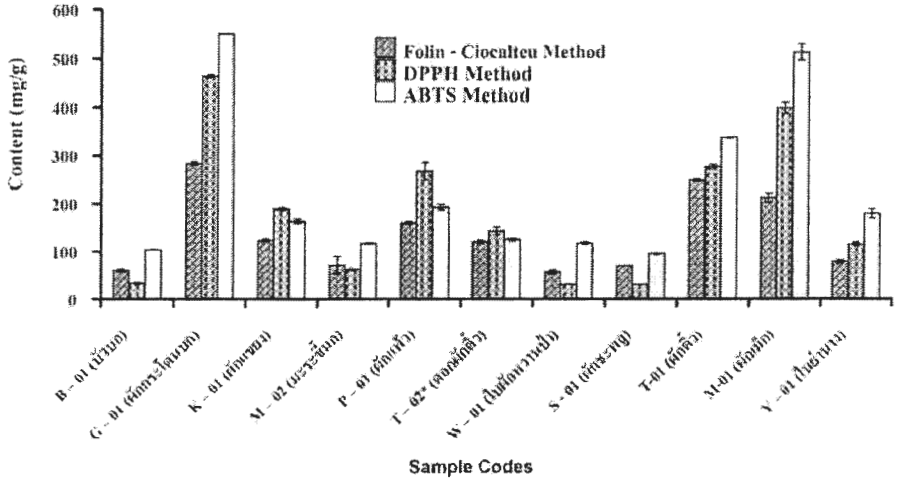
ส่วนปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและสมุนไพรด้วยวิธี DPPH เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก (463.54) > ผักเม็ก (397.25) > ผักติ้ว (276.52) > ผักแพ้ว (266.94) > ผักแขยง (189.19) > ดอกผักติ้ว (143.24) > ใบย่านาง (114.49) > มะระขี้นก (61.82) > บัวบก (33.63) ~ ใบผักหวานป่า (31.06) ~ ผักชะพลู (30.35) mg of Trolox / g of sample โดยแนวโน้มของปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระนั้น พบว่าส่วนใหญ่แล้ววิธี ABTS มักให้ปริมาณสูงกว่าวิธี DPPH ทั้งนี้เนื่องจากอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาสูง ในขณะที่วิธี DPPH ใช้อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีเสถียรภาพที่สูงกว่า[6] ด้วยเหตุนี้เองสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความแรงหรือว่องไวที่น้อยกว่าจึงไม่ได้ทำปฏิกิริยา $DPPH^{\bullet}$ ทำให้ผลการตรวจประเมินด้วยวิธี DPPH ที่ได้จึงมีปริมาณการตรวจพบที่ต่ำกว่า เมื่อนำผลการทดลองของเทคนิค ABTS และ DPPH มาเปรียบเทียบกันเพบว่า ผลลัพธ์วิเคราะห์จากทั้งสองเทคนิคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เมื่อทดสอบด้วย *t*-test ($t_{observed}$ = 2.515, $t_{critical}$ = 3.169) และลำดับของปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและพืชสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดที่ได้จากทั้งสองเทคนิคมีความสอดคล้องกัน

***2 ปริมาณรวมของสารฟีโนลิกส์โดยวิธี Folin-Ciocalteau***

ผลการทดลองพบว่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบในผักและพืชสมุนไพรด้วยวิธี Folin-Ciocalteau เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ ผักกระโดนบก (283.45) > ผักติ้ว (248.96) > ผักเม็ก

(211.40) > ผักแพ้ว(160.22) > ผักแขยง (123.37) > ดอกผักติ้ว (119.69) > ใบย่านาง (78.61) > มะระขี้นก (71.74) ~ ผักชะพลู (69.84), บัวบก (60.83) ใบผักหวานป่า (56.80) mg of gallic acid / g of sample

เมื่อเปรียบเทียบค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธี DPPH, ABTS และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์จากวิธี Folin-Ciocalteau ในตัวอย่างผักและพืชสมุนไพร 11 ชนิด (รูปที่ 2) ผักกระโดนบก ผักเม็ก และ ผักติ้วป่าซึ่งมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูง (3 ลำดับแรก) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ สูงเป็น 3 ลำดับแรกเช่นกัน คือ ผักกระโดนบก (283.45) ผักติ้ว (248.96) และ ผักเม็ก (211.40) ผลการทดลองจากปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบมากในผักติ้วสอดคล้องกับผลการศึกษา[12, 13] ซึ่งรายงานว่าสารประกอบฟีโนลิกส์หลักที่พบในผักติ้วคือ chlorogenic acid




**รูปที่ 2** แผนภาพการเปรียบเทียบค่าผลลัพธ์วิเคราะห์ปริมาณรวมสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธี DPPH , ABTS และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์จากวิธี Folin-Ciocalteau ในตัวอย่างผักพื้นบ้าน 11 ชนิด (ในจังหวัดอุบลราชธานี)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากทั้ง 3 วิธีพบว่าสามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตามปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็น 3 ประเภทคร่าว ๆ ดังนี้ 1) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ ผักกระโดนบก ผักเม็ก และ ผักติ้วป่า 2) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ได้แก่ ผักแพ้ว ใบย่านาง ผักแขยง และ ดอกผักติ้ว 3) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ มะระขี้นก บัวบก ใบผักหวานป่า และ ผักชะพลู ผลลัพธ์วิเคราะห์จากตัวอย่างผักพื้นบ้านทั้ง 11 ชนิด ส่วนใหญ่พบว่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์นั้นสอดคล้องกับปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่เคยมีการรายงามาแล้ว[14-16] สรุปได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ในผักและพืชสมุนไพรเหล่านี้มีองค์ประกอบที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีโนลิกส์

## บทสรุป

จากผลการทดลองเพื่อประเมินหาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS และ DPPH และปริมาณรวมของสารประกอบฟีโนลิกส์โดยวิธี Folin-Ciocalteu ในผักและพืชสมุนไพร 11 ชนิดที่นิยมบริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี พบว่าผักและสมุนไพรที่นำมาศึกษามีสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกส์เป็น

องค์ประกอบ และสามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตามปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็น 3 ประเภทดังนี้ 1) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ ผักกระโดนบก และผักเม็ก 2) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระปานกลางได้แก่ ผักติ้ว ผักแพ้ว ใบย่านาง ผักแขยง ดอกผักติ้ว และ 3) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ มะระขี้นก บัวบก ใบผักหวานป่า และ ผักชะพลู ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีโนลิกส์ที่พบในผักและสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดมีค่าที่แตกต่างกันตั้งแต่เพียงเล็กน้อยจนถึงประมาณเกือบ 10 เท่าขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยสามารถแบ่งผักและพืชสมุนไพรออกตามปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็น 3 ประเภทคร่าว ๆ ดังนี้ 1) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ ผักกระโดนบก ผักเม็ก และ ผักติ้ว 2) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ได้แก่ ผักแพ้ว ใบย่านาง ผักแขยง และ ดอกผักติ้ว 3) ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ได้แก่ มะระขี้นก บัวบก ใบผักหวานป่า และ ผักชะพลูนอกจากนี้ จากผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัย[1416] ที่พบว่าผักและสมุนไพรที่มีสารประกอบฟีโนลิกส์สูงมักมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสูงร่วมด้วย ผลลัพธ์วิเคราะห์จากการทดลองในผักและพืชสมุนไพรทั้ง 11 ชนิดสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการเลือกรับประทานผักและสมุนไพรเพล่านี้ให้เหมาะสมกับความต้องการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมีสำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยและทุนการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

[1] Mittler, R., **Trends Plant Sci.,7** (2002), pp405-410.

[2] Zulueta, A., Esteve, M. J., Frasquet, I., & Frigola, A.,**Food Chem., 103** ((2007, pp..1374-1365

[3] Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L., **J. Agric. Food Chem., 44** ((1996, pp..705-701

[4] Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., **Clin. Sci. 84** (1993), pp.407-412.

[5] Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., **LWT-Food Sci. Technol. 28** (1995), 25-30.

[6] โอภา วัชระคุปต์, **สารต้านอนุมูลอิสระ *RADICAL SCAVENGING AGENT***. (2550)กรุงเทพ :นิวไทยมิตรการพิมพ์.

[7] Cowan, M. M., **Clinical microbiology 12** (1999), pp.564-582.

[8] วาริน แสงกิตติโกมล, **วารสารสหเวชศาสตร์ 3**(2546), pp. 91-99.

[9] Shahidi, F. and Wanasundara, P.K.J., **Crit Rev Food Sci Nutr. 32** (1992), pp. 67-103.

[10] Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L., **J. Agric. Food Chem., 53** ((2005, pp..1856-1841

[11] Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., & Boas, L. V., **Food Sci. Technol. Int.** *(London, U. K.), **12*** (2006), pp.385-395.

[12] Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M. H., **J. Agric. Food Chem.**, ***54*** (2006), pp.2719-2725

[13] Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M. H., . **Food Chemistry, 100** (2007), pp.1620-1629.

[14] Kaur, C. and Kapoor, H.C., **Int. J. of Food Sci. and Tech. 37** (2002), pp. 153-161.

[15] Thaipoong, K., Boonprakob, U., Zevallos, L.S. and Byrne, D, ***Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 36** (2005), pp. 254-257.

[16] นันท์นภัส เดิมวงศ์, **ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 8** (2551), pp.41-48.

**รายงานสรุปการเงิน**

**โครงการ:** การพัฒนาเทคนิควิเคราะห์แอมเพอร์โรเมทรีแบบใหม่สำหรับวิเคราะห์และประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพรไทย

**ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน** นางสาว มะลิวรรณ อมตธงไชย

**รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่** 1 เมษายน 2552 **ถึงวันที่** 30 กันยายน 2552

| รายการ | งบปี 2551 | รายจ่าย | คงเหลือ |
|---|---|---|---|
| **1. งบบุคลากร** | **358,800** | | |
| ค่าจ้างเหมาผู้ช่วยวิจัย (12X7,600 บาท) | 91,200 | 91,400 | -200 |
| **2. งบดำเนินการ** | | | |
| **2.1 ค่าตอบแทน ใช้สอยและวัสดุ** | | | |
| 2.1.1 **ค่าตอบแทน** (ค่าอาหารทำการนอกเวลา) (อัตรา 200 บาท/วัน X 100 วัน) | 20,000 | 5,000 | 15,000 |
| 2.1.2 **ค่าใช้สอย** | | | |
| -ค่าจ้างเหมาพิมพ์/จัดทำรูปเล่มรายงาน | 5,000 | 5,000 | 0 |
| -ค่าจ้างเหมาจัดทำฐานข้อมูลและประชาสัมพันธ์ผลงาน | 5,000 | 2,500 | -2,500 |
| -อุปกรณ์และเครื่องใช้สำนักงาน | 5,000 | 4,948 | 52 |
| -ค่าถ่ายเอกสาร | 3,000 | 5,035 | -2,035 |
| -ค่าจ้างวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค GC-MS | 3,000 | 0 | 3,000 |
| -ค่าจ้างวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคมาตรฐาน | 3,000 | 0 | 3,000 |
| -ค่าเดินทางเพื่อเสนอผลงานภายในประเทศ | 5,000 | 0 | 5,000 |
| -ค่าสืบค้นข้อมูลทั้งในและต่างประเทศ | 5,000 | 0 | 5,000 |
| -ค่าสาธารณูปโภคของโครงการเช่น ค่าไปรษณีย์โทรเลข | 3,000 | 3,468 | -468 |
| 2.1.3 **ค่าวัสดุ** | | | |
| -สารเคมีและเครื่องแก้ว | 85,000 | 152,672.56 | -67,672.56 |
| - อุปกรณ์และวัสดุวิทยาศาสตร์ | 85,000 | 49,804.18 | 35,195.82 |
| - วัสดุคอมพิวเตอร์ | 5,000 | 6,365 | -1,365 |
| -วัสดุหนังสือ วารสารและตำรา | 3,000 | 128 | 2,872 |
| **2.2 ค่าสาธารณูปโภค** | | | |
| -ค่าสาธารณูปโภค (คณะ 5% ,มหาวิทยาลัย 5%) | 32,600 | 32,600 | 0 |
| **รวมงบประมาณทั้งสิ้น** | **358,800** | **358,920.74** | **-120.74** |