



การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและ
เชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากผลพิทูล

โดย

นายชัยยันต์ บุญยยืน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและ
เชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากผลพิทูล

โดย
นายชัยยันต์ บุญยีน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**DEVELOPMENT OF AND ELECTROCHEMICAL METHOD FOR THE
QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL
ANTIOXIDANTS IN THE FRUIT OF *MIMUSOPS ELENGI* LINN EXTRACTED**

By

Chaiyan Boonyuen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Chemistry

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2007

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า เพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากผลพิทูล” เสนอโดย นายชัยยันต์ บุญยีน เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริชัย ชินะดังกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัศมี ชัยสุขสันต์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรนาถ สุนทรวัฒน์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. โอภา บางเจริญพรพงศ์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัศมี ชัยสุขสันต์)

...../...../.....

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรนาถ สุนทรวัฒน์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คลฤดี นิมพาลี)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศรี ลีจิระจำเนียร)

...../...../.....

47310201 : สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

คำสำคัญ : พิกุล/ สารแอนติออกซิแดนท์/ ไซคลิกโวลแทมเมตรี/ โครมาโตกราฟี/ สเปกโตรเมตรี

ชัชยันต์ บุญเย็น : การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากผลพิกุล. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.รัสมิ ชัยสุขสันต์ และ ผศ.ดร.อรนาถ สุนทรวัฒน์. 146 หน้า.

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลพิกุล (*Mimusops elengi* Linn.) ทำการสกัดสารจากผลพิกุลอ่อน แก้วจัด และสุกโดยใช้ 70% เมทานอล:70% อะซีโตน อัตราส่วน 1 : 1 (v/v) ในการสกัด ได้เป็นสองส่วนคือ crude extract และ residue และสกัดแยก crude extract และ residue ออกเป็น fraction ต่างๆ คือ free phenolic acids fraction (F1) soluble phenolic acid esters fraction (F2) และ insoluble-bound phenolic acids fraction (F3) นำ F1, F2 และ F3 ของผลพิกุลอ่อนมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี คือ Thin layer chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าในสารสกัดจากผลพิกุลมี gallic acid เป็นองค์ประกอบหลักในทุกๆ fraction ทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ crude extract และ fraction ต่างๆโดยใช้เทคนิค electrochemistry เปรียบเทียบกับวิธีทาง spectrometry สำหรับเทคนิคทาง electrochemistry ใช้เทคนิค Cyclic Voltammetry (CV) และ Differential Pulse Voltammetry (DPV) และเทคนิค spectrometry คือ DPPH และ ABTS สำหรับทุกๆเทคนิคพบว่าใน crude extract ของผลพิกุลอ่อนมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าผลแก้วจัดและผลสุก แสดงว่าในผลพิกุลมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ไปตามระยะเวลาการสุก และในสารสกัดของ fraction ต่างๆ พบว่าในพิกุลผลอ่อน และ ผลแก้วจัด fraction2 มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีกว่า fraction 3 และ fraction 1 แสดงว่าในพิกุลผลอ่อนสารประกอบฟีนอลส่วนใหญ่อยู่ในรูป soluble phenolic acid esters ส่วนในพิกุลผลสุกพบว่าสารสกัดทั้งสาม fraction ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าในพิกุลผลสุก สารประกอบฟีนอลอยู่ทั้งในรูป free phenolic acids soluble phenolic acid esters และ insoluble-bound phenolic acids จึงสามารถใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าเพื่อการวิเคราะห์ antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุลได้

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2.

47310201 : MAJOR : ANALYTICAL CHEMISTRY

KEY WORD : PIKUL/ ANTIOXIDANT/ CYCLIC VOLTAMMETRY/ CHROMATOGRAPHY/
SPECTROMETRY

CHAIYAN BOONYUEN : DEVELOPMENT OF AND ELECTROCHEMICAL METHOD
FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL
ANTIOXIDANTS IN THE FRUIT OF *MIMUSOPS ELENGI* LINN. EXTRACTED. THESIS
ADVISORS : ASST. PROF. RASAMEE CHAISUKSANT, Ph.D. AND ASST. PROF. ORANART
SUNTORNWAT, Ph.D. 146 pp.

In this study, the antioxidant activities of the crude extracts from difference stages of ‘Pikul’ (*Mimusops elengi* Linn.) fruit were determined. The crude extracts and residues were prepared from the fruit using 70% methanol : 70% acetone (1:1). The crude extracts and residues were then subjected to sequential extraction. Three fractions as free phenolic acids (F1), soluble phenolic acid esters (F2) and insoluble-bound phenolic acids (F3) were obtained. The three fractions from the immature green fruit were chromatographically analyzed. The results from both TLC and HPLC confirmed the presence of gallic acid as the main component in all fractions. The antioxidant activities from the crude extracts and their corresponding fractions were determined by both electrochemical and spectrophotometric methods. Two electrochemical techniques, Cyclic Voltammetry (CV) and Differential Pulse Volmmetry (DPV) were used. Free radical scavenging assays using DPPH and ABTS were used as spectrophotometric techniques. The antioxidant activities obtained from both techniques showed good correlation. The highest antioxidant activity was found in the crude extract from the immature green followed by those of the mature green and ripe. This implied the change in the chemical constituents of the fruit at different developmental stages. The F2 from the immature and the mature green had higher antioxidant activitien than F3 and F1, suggesting that in these two stages the phenolic compounds remained in soluble phenolic acid esters. For the ripe fruit, the antioxidant activities are about the same in all fractions, indicating that the phenolic compounds were in the free phenolic acids, soluble phenolic acid esters and insoluble-bound phenolic acids. From this study the electrochemical technique was found to be a promising alternative method for antioxidant activity determination.

Department of Chemistry

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2007

Student’s signature.....

Thesis Advisors’ signature 1. 2.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ที่สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้ทำวิจัยต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัศมิ์ ชัยสุขสันต์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรณาท สุนทรวัฒน์ อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัยที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนวคิด คำแนะนำ ตลอดจนการตรวจและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ด้วยความดูแลเอาใจใส่ตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา วังกานต์ อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. โอภา บางเจริญพรพงศ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คลฤดี นิมพาลี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศรี ลีจิระจำเริญ กรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจแก้ไข และให้แนวคิดรวมทั้งคำแนะนำอันมีคุณค่าแก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่มอบทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมีและอุปกรณ์การทดลองต่างๆ ตลอดงานวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 สารประกอบฟีนอล (Phenolic compound).....	2
1.2 ข้อมูลทั่วไปของพิกุล.....	10
1.3 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดผลพิกุล.....	11
1.4 วิธีการวิเคราะห์ antioxidant โดยเทคนิค voltammetry.....	14
1.5 วิธีการวิเคราะห์ antioxidant activity โดยวิธี spectrometry.....	20
1.6 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	23
2 สารเคมีและเครื่องมือ.....	24
2.1 เครื่องมือ / อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	24
2.2 สารเคมี.....	25
2.3 การเตรียมสารละลาย.....	26
2.4 ตัวอย่าง.....	27
3 การทดลองและผลการทดลอง.....	28
3.1 ขั้นตอนการสกัดผลพิกุล.....	28
3.1.1 การเตรียมตัวอย่างผลพิกุลเพื่อเก็บในรูป freeze dried sample.....	28
3.1.2 การสกัดแยกสาร antioxidant จากผลพิกุลเป็น crude extract.....	28
3.1.3 การสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลจากผลพิกุล.....	28
3.2 การศึกษาสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากผลพิกุลโดยใช้เทคนิค thin-layer chromatography (TLC) และการหาปริมาณ antioxidant ในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC.....	32
3.3 การวิเคราะห์ antioxidant ในสารสกัดจากผลพิกุลโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV).....	36

บทที่	หน้า
3.3.1 Pretreatment ขั้ว working electrode (GCE).....	36
3.3.2 การศึกษาผลของ pH ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant	37
3.3.3 การศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolytes ต่อ cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิทูล.....	45
3.3.4 การเลือกสารมาตรฐาน antioxidant สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง.....	48
3.3.5 การศึกษาผลของ scan rate ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid.....	50
3.3.6 การทำ calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จากเทคนิค cyclic voltammetry.....	53
3.3.7 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid.....	56
3.3.8 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ใน crude extract ของพิทูลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก.....	58
3.3.9 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ของสารสกัด fraction 1-3 ในสาร สกัดจากผลพิทูลอ่อน	60
3.3.10 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ของสารสกัด fraction 1-3 ในสารสกัดจากผลพิทูลแก่จัด.....	62
3.3.11 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ของสารสกัด fraction 1-3 ในสารสกัดจากผลพิทูลสุก.....	64
3.4 การศึกษา antioxidant activity โดยวิธี spectrometry.....	66
3.4.1 Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical capacity assay (DPPH assay).....	66
3.4.2 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging assay : (ABTS assay).....	95
3.5 การศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัดจากพิทูลด้วยเทคนิค Folin-Denis assay.....	121
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	125

บทที่	หน้า
4.1 การสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลจากผลพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก.....	125
4.2 การศึกษา antioxidant ในสารสกัดจากผลพิกุลด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) และการหาปริมาณ antioxidant ในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC.....	126
4.3 การศึกษาสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากผลพิกุลโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV).....	127
4.3.1 การศึกษาผลของ pH ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant	127
4.3.2 การศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolytes ต่อ cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิกุล.....	129
4.3.3 การเลือกสารมาตรฐาน antioxidant สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง.....	130
4.3.4 การศึกษาผลของ scan rate ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid	130
4.3.5 การทำ calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จากเทคนิค cyclic voltammetry.....	131
4.3.6 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid.....	131
4.3.7 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุล.....	132
4.4 การศึกษา antioxidant capacity โดยวิธี spectrometry.....	134
4.4.1 Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical capacity assay (DPPH assay)	134
4.4.2 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical – scavenging assay : (ABTS assay).....	137
4.4.3 การศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัดจากพิกุลโดย Folin-Denis assay.....	140
เอกสารอ้างอิง.....	143
ประวัติผู้วิจัย.....	145

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ประเภทต่างๆของสารประกอบฟีนอล	3
2.1 รายชื่อสารเคมี บริษัทผู้ผลิต และเกรด	25
3.1 น้ำหนักสารสกัด % yield และความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลระยะต่างๆ	31
3.2 ค่า R_f ของสารละลายมาตรฐาน catechin catechol gallic acid quercetin และสารสกัดจากพิกุลผลอ่อน fraction1 2 และ 3	33
3.3 ปริมาณ gallic acid ในสารสกัดจากผลพิกุลอ่อน	35
3.4 ค่า E_{pa} E_{c} i_{pa} และ i_{pc} ของสารละลายมาตรฐานใน acetates buffer pH 4.5	41
3.5 ค่า E_{pa} E_{c} i_{pa} และ i_{pc} ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant ใน phosphate buffer pH 7.0	42
3.6 ค่า E_{pa} E_{c} i_{pa} และ i_{pc} ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant ใน NH_3/NH_4Cl pH 9.0	43
3.7 ค่า E_{pa} และ i_{pa} ของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction 2 เข้มข้น 1,308 ppm ในสารละลาย buffer pH ต่างๆ	46
3.8 ค่า E_{pa} และ i_{pa} ของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction2 เข้มข้น 1,308 ppm และ สารมาตรฐาน (gallic acid, trolox, epigallocatechin gallate (EGCG), ascorbic acid, caffeic acid และ catechin) เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5	49
3.9 ค่า E_{pa} และ i_{pa} จาก cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน 0.40 mM gallic acid ที่ scan rate ต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5	50
3.10 ค่า i_{pa} และ Q ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5	54
3.11 ค่า i_{pa} และ พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5	57
3.12 ค่า i_{pa} และพื้นที่ใต้พีค (Q) ของ crude extract จากผลพิกุล	59
3.13 ค่า GAE ของ crude extract จากผลพิกุล	59
3.14 พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารสกัดจากผลพิกุลผลอ่อน fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5	61
3.15 ค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิกุลผลอ่อน fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5	61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.16 พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารสกัดจากผลพิกุลผลแก่จัด fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5	63
3.17 ค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิกุลผลแก่จัด fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5	63
3.18 พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารสกัดจากผลพิกุลผลสุก fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5	65
3.19 ค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิกุลผลสุก fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5	65
3.20 ค่า absorbance และอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆของ DPPH radical ผสมกับสารสกัด fraction2 ของพิกุลผลอ่อน และ DPPH radical ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid	68
3.21 ปริมาตรของ DPPH reagent กับสารละลายมาตรฐานอย่างละ 100 ppm ของ ascorbic acid, caffeic acid, catechin, catechol , EGCG, gallic acid และ trolox โดย DPPH assay	70
3.22 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ ascorbic acid โดย DPPH assay (n = 5)	71
3.23 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ caffeic acid โดย DPPH assay (n = 5)	71
3.24 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ catechin โดย DPPH assay (n = 5)	72
3.25 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ catechol โดย DPPH assay (n = 5)	72
3.26 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ EGCG โดย DPPH assay (n = 5)	73
3.27 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ gallic acid โดย DPPH assay (n = 5)	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.28 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ trolox โดย DPPH assay (n = 5)	74
3.29 สมการ, R ² และ EC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง	75
3.30 ปริมาตรของสารสกัดจาก crude extract ของพืกระยะผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก กับสารละลาย DPPH reagent	76
3.31 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R) ของผลพืกระยะผลอ่อน ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	76
3.32 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R) ของผลพืกระยะผลแก่จัด ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	77
3.33 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R) ของผลพืกระยะผลสุก ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	77
3.34 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดผลพืกระยะผลอ่อน ผลแก่จัดและ ผลสุกโดยวิธี DPPH assay	79
3.35 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพืกระยะผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย DPPH reagent	80
3.36 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R) ของ fraction 1 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	81
3.37 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R) ของ fraction 2 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	81
3.38 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R) ของ fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	82
3.39 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดผลพืกระยะผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดย DPPH assay	84
3.40 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพืกระยะผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย DPPH reagent	85
3.41 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ fraction 1 ครั้งที่ 1 – 5 วิธี DPPH assay	86
3.42 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ fraction 2 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	86

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.43 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	87
3.44 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดผลพิกลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี DPPH assay	89
3.45 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย DPPH reagent	90
3.46 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ fraction 1 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	91
3.47 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ fraction 2 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	91
3.48 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH [•] ของ fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay	92
3.49 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดผลพิกลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดย DPPH assay	94
3.50 ค่า absorbance และอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆของ ABTS ⁺ + fraction2 เข้มข้น 4.23 ppmของผลพิกลอ่อน และ ABTS ⁺ + สารละลายมาตรฐาน gallic acid	97
3.51 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ ของสารมาตรฐาน gallic acid โดย ABTS assay	100
3.52 ปริมาตร crude extract จากผลพิกลระยะผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก กับสารละลาย ABTS ⁺ reagent	101
3.53 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ จาก crude extractของผลพิกลอ่อน ครั้งที่ 1 – 5 โดยวิธี ABTS assay	102
3.54 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ จาก crude extract ของผลพิกลแก่จัด ครั้งที่ 1 – 5 โดยวิธี ABTS assay	102
3.55 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ จาก crude extractของผลพิกลสุก ครั้งที่ 1 – 5 โดยวิธี ABTS assay	103
3.56 ค่า EC ₅₀ ของ crude extract จากผลพิกลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก โดย ABTS assay	105

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.57 ค่า GAE ของ crude extract จากผลพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัดและผลสุก โดย ABTS assay	105
3.58 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย ABTS ⁺ • reagent	106
3.59 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของพิกุลผลอ่อน fraction 1 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay	107
3.60 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของพิกุลผลอ่อน fraction 2 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay	107
3.61 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของพิกุลผลอ่อน fraction 3 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay	108
3.62 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดย ABTS assay	110
3.63 ค่า GAE ของสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี ABTS assay	110
3.64 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย ABTS ⁺ • reagent	111
3.65 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของผลพิกุลแก่จัด fraction 1 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay	112
3.66 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของผลพิกุลแก่จัด fraction 2 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay	112
3.67 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของผลพิกุลแก่จัด fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย ABTS assay	113
3.68 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดผลพิกุลผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี ABTS assay	115
3.69 ค่า GAE ของสารสกัดผลพิกุลผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดย ABTS assay	115
3.70 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลสุก fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย ABTS ⁺ • reagent	116
3.71 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของพิกุลผลสุก fraction 1 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay	117
3.72 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R) ของพิกุลผลสุก fraction 2 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay	117

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.73 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS ^{•+} (%R) ของพิกุลผลสุก fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย ABTS assay	118
3.74 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดพิกุลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดย ABTS assay	120
3.75 ค่า GAE ของสารสกัดพิกุลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี ABTS assay	120
3.76 ค่า absorbance ที่ 700 nm ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid	120
3.77 ปริมาตรของสารสกัดจากพิกุล	123
3.78 ค่า GAE ของสารสกัดพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดย Folin-Denis Assay	123
3.79 ค่า GAE ของสารสกัดพิกุลผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดย Folin-Denis Assay	124
3.80 ค่า GAE ของสารสกัดพิกุลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดย Folin-Denis Assay	124
4.1 % yield และความเข้มข้น ของสารสกัดจากพิกุลระยะต่างๆ	125
4.2 ค่า E _{pa} และ i _{pa} จาก cyclic voltammogram ของสารมาตรฐาน antioxidants ใน supporting electrolyte pH 4.5 7.0 และ 9.0	127
4.3 ค่า E _{pa} ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant จากงานวิจัยอื่นๆ	128
4.4 ค่า E _{pa} และ i _{pa} ของสารสกัดจากพิกุลแก่จัด fraction2 เข้มข้น 1,308 ppm ในสารละลาย buffer pH ต่างๆ	129
4.5 ค่า GAE ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก	132
4.6 สมการ และค่า EC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant ที่ได้จากการทดลอง	134
4.7 ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัดและ ผลสุกโดย DPPH assay	135
4.8 ค่า GAE ของสารสกัดพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก โดยวิธี ABTS assay	137
4.9 ค่า GAE ของสารสกัดจาก พิกุล	138
4.10 ตารางเปรียบเทียบ antioxidant activity โดย DPPH assay และ ABTS assay	139
4.11 ตารางเปรียบเทียบ antioxidant activity โดย HPLC DPV และ Folin-Denis assay	139

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างพื้นฐานฟีนอล	2
1.2 ดอกพิกุล	10
1.3 ผลพิกุล	10
1.4 (a) Potential excitation signal และ (b) Response signal ของเทคนิค cyclic voltammetry	14
1.5 เซลล์เคมีไฟฟ้าของเทคนิค CV	15
1.6 (a) potential excitation signal และ (b) response signal ของเทคนิค DPV	15
1.7 โครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)	20
1.8 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)..	21
3.1 รูปที่ 3.1 พังการสัปดาห์สารประกอบฟีนอล	30
3.2 Chromatogram ของสารสกัดจากพิกุลผลอ่อน (1) fraction1 (2) fraction2 (3) fraction3 (4) catechin (5) catechol (6) gallic acid และ (7) quercetin	32
3.3 โครมาโทแกรมของการแยกในสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 3 ppm	33
3.4 โครมาโทแกรมของการแยกใน (a) F1 (40 dilution), (b) F2 (1,000 dilution) และ F3 (100 dilution) แสดงตำแหน่งที่เป็น gallic acid	34
3.5 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid	35
3.6 Cyclic voltammogram จากการทำ electrode pretreatment ด้วยโซลูชันโดยใช้ 0.1 M NaHCO ₃	36
3.7 Cyclic voltammograms ของสารมาตรฐานเข้มข้น 0.2 และ 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5	38
3.8 Cyclic voltammograms ของสารมาตรฐานเข้มข้น 0.2 และ 0.4 mM ใน phosphate buffer pH 7.0	38
3.9 Cyclic voltammograms ของสารมาตรฐานเข้มข้น 0.2 และ 0.4 mM ใน NH ₃ /NH ₄ Cl buffer pH 9.0	38
3.10 Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากพิกุลแก่จัด fraction2 เข้มข้น 1,308 ppm ในสารละลาย buffer pH ต่างๆ	45
3.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง E _{pa} กับ pH เพื่อศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolyte ต่อ E _{pa} ของสารสกัดจากพิกุลผลแก่ fraction 2 เข้มข้น 1,308 ppm	46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง i_{pa} กับ pH เพื่อศึกษาผลของชนิด pH ของ supporting electrolyte ต่อ E_{pa} ของสารสกัดจากพิกุลผลแก่ fraction 2 เข้มข้น 1,308 ppm	47
3.13 Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากพิกุลผลแก่ fraction 2 เข้มข้น 1,308 ppm, gallic acid, tolox, epigallocatechin gallate (EGCG), ascorbic acid, caffeic acid และ catechin เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5	48
3.14 Cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน 0.40 mM gallic acid ที่ scan rate ต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5	50
3.15 พล็อตระหว่าง i_{pa} กับ $v^{1/2}$ จาก cyclic voltammogram ของ gallic acid เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5	51
3.16 พล็อตระหว่าง i_{pa} กับ v จาก cyclic voltammogram ของ gallic acid เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5	51
3.17 พล็อตระหว่าง $\log(i_{pa})$ กับ $\log(\text{scanrate})$ จาก cyclic voltammogram ของ gallic acid เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5	52
3.18 Cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5	53
3.19 พล็อตระหว่าง i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry	54
3.20 พล็อตระหว่าง Q กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry	55
3.21 Differential pulse voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5	56
3.22 พล็อตระหว่าง พื้นที่ใต้พีค (Q) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้เทคนิค DPV	57
3.23 Differential pulse voltammograms ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุกใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM	58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.24 Differential pulse voltammograms ของสารสกัดจากผลพิกุลผลอ่อน fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลาย มาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM	60
3.25 Differential pulse voltammograms ของสารสกัดจากผลพิกุลผลแก่จัด fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลาย มาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM	62
3.26 Differential pulse voltammograms ของสารสกัดจากผลพิกุลผลสุก fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลาย มาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM	64
3.27 Spectra ของ DPPH radical และ DPPH radical ผสมกับสารมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดพิกุล	67
3.28 Kinetic curve ของ DPPH radical ผสมกับสารสกัด fraction2 ของพิกุลผลอ่อน และ DPPH radical ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid	67
3.29 พล็อตระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับเวลาของ DPPH radical + fraction2 ของพิกุลผลอ่อน และ DPPH radical + สารละลายมาตรฐาน gallic acid	69
3.30 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining กับ ความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด โดย DPPH assay	74
3.31 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกุลอ่อน	78
3.32 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกุลแก่จัด	78
3.33 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกุลสุก	79
3.34 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกุลอ่อน fraction 1	82
3.35 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกุลอ่อน fraction 2	83

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.36 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกลอ่อน fraction 3	83
3.37 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกลแก่จัด fraction 1	87
3.38 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกลแก่จัด fraction 2	88
3.39 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกลแก่จัด fraction 3	88
3.40 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกลสุก fraction 1	92
3.41 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกลสุก fraction 2	93
3.42 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH [•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก ผลพิกลสุก fraction 3	93
3.43 Spectrum ของ ABTS ^{•+} reagent และ ABTS ^{•+} reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดผลพิกลอ่อน fraction2	96
3.44 Kinetic curve ของ ABTS ^{•+} reagent และ ABTS ^{•+} reagent + std.Gallic acid (Abs vs time)	96
3.45 พล็อตระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับเวลาของ ABTS ^{•+} + fraction2 เพิ่มขึ้น 4.23 ppm ของพิกลผลอ่อน และ ABTS ^{•+} + สารละลายมาตรฐาน gallic acid	98
3.46 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน gallic acid	100
3.47 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก crude extract ของผลพิกลอ่อน	103
3.48 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก crude extract ของผลพิกลแก่จัด	104

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.49 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก crude extract ของผลพิกุลสุก	104
3.50 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากพิกุลผลอ่อน fraction 1	108
3.51 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากพิกุลผลอ่อน fraction 2	109
3.52 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากพิกุลผลอ่อน fraction 3	109
3.53 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากผลพิกุลแก่จัด fraction 1	113
3.54 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากผลพิกุลแก่จัด fraction 2	114
3.55 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากผลพิกุลแก่จัด fraction 3	114
3.56 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากพิกุลผลสุก fraction 1	118
3.57 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากพิกุลผลสุก fraction 2	119
3.58 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS ^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด จากพิกุลผลสุก fraction 3	119
3.59 calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยเทคนิค Folin-Denis Assay	122
4.1 กราฟแสดงค่า GAE ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPV	132
4.2 กราฟแสดงค่า GAE ของ fraction 1 - 3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPV	133

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 กราฟแสดงค่า EC_{50} ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPPH assay	136
4.4 กราฟแสดงค่า EC_{50} ของ fraction 1 – 3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPPH assay	136
4.5 กราฟแสดงค่า GAE ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค ABTS assay	138
4.6 ค่า GAE ของ fraction 1 -3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดย เทคนิค ABTS assay	139
4.7 กราฟแสดงค่า GAE ของ fraction 1 -3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค Folin-Denis assay	141

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันคนไทยหันมาสนใจสุขภาพกันมากขึ้นมีการเลือกรับประทานอาหาร มีการออกกำลังกาย เรื่องการสูบบุหรี่ การดื่มสุรา และการออกกำลังกาย จากสถิติที่ผ่านมาพบว่าคนไทยและคนทั่วโลก มีอัตราการเสียชีวิตโรคหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้นมาก สาเหตุที่สำคัญเกิดจากความไม่สมดุลของการรับประทานอาหารและการออกกำลังกาย นอกจากนั้นยังทำให้เกิดโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภาวะอ้วน โรคอ้วนและโรคเมตาบอลิก สาเหตุหนึ่งถูกอ้างว่ามาจากการได้รับอนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว อยู่รอบนอกจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ซึ่งโมเลกุลหรืออะตอมชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระเช่น superoxide anion radical (O_2^-) hydroxyl radical ($HO^\bullet$) peroxide radical ($ROO^\bullet$) ozone (O_3) peroxy radical ($LOO^\bullet$) hydrogen peroxide (H_2O_2) singlet oxygen (1O_2) hydrogen radical ($H^\bullet$) methyl radical ($CH_3^\bullet$) โดยปกติแล้วร่างกายของมนุษย์เราสามารถที่จะกำจัดอนุมูลอิสระได้ด้วยตัวเอง ถ้าอนุมูลอิสระในร่างกายมีจำนวนไม่มากหรือร่างกายอยู่ในสภาวะปกติ แต่ถ้าร่างกายอยู่ในสภาวะผิดปกติหรืออยู่ในสภาวะเป็นโรค ซึ่งในสภาวะนี้ร่างกายจะมีปริมาณอนุมูลอิสระมากกว่าที่ระบบกำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายจะกำจัดได้ จึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพื่อไปช่วยเสริมให้แก่อาหารจำพวกผักและผลไม้

ในระบบของสิ่งมีชีวิต มีต้นกำเนิดของสารต้านอนุมูลอิสระอย่างน้อย 4 แหล่ง ซึ่งได้แก่

1. enzyme ยกตัวอย่างเช่น superoxide dismutase, glutathione peroxidase, และ catalase
2. โมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น albumin, ceruloplasmin, ferritin และโปรตีนอื่นๆ
3. โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ascorbic acid, glutathione, uric acid, tocopherol, carotenoids, (poly)phenols
4. ฮอร์โมนต่างๆ ได้แก่ estrogen, angiotensin, melatonin

การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณเพิ่มขึ้นในระยะสิบปีที่ผ่านมา จำนวนของวิธีการและความหลากหลายของกระบวนการที่จะวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ในพืช ที่ถูกนำเสนอออกมาเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

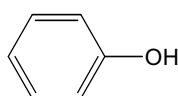
การประชุมนานาชาติครั้งแรกเกี่ยวกับวิธีการหาสารต้านอนุมูลอิสระ ได้จัดขึ้นที่ Orlando, Florida สหรัฐอเมริกาในเดือนมิถุนายน 2004 โดยมีจุดประสงค์ที่จะหากระบวนการทางการวิเคราะห์เพื่อหาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ในอาหาร พืชสมุนไพร ยา และ ส่วนประกอบของอาหารอื่นๆ และเพื่อที่จะเสนอวิธีการทางการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานในการหาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [1]

สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละตัวอาจจะมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาหลายขั้นตอนในระบบหนึ่ง แต่ อาจเกิดปฏิกิริยาขึ้นตอนเดียวในอีกระบบหนึ่ง นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระอาจจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระหรือแหล่งอนุมูลอิสระได้แตกต่างกันอย่างเช่น carotenoid จะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่ดีต่ออนุมูลอิสระจำพวก peroxy เมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็น phenolics หรือสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ แต่ว่าจะเป็นตัวหยุดที่ดีมากสำหรับ singlet oxygen ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆจะไม่มีประสิทธิภาพเลยต่อ singlet oxygen อย่างไรก็ตาม singlet oxygen ไม่ใช่อนุมูลอิสระ และไม่ได้เกิดปฏิกิริยาผ่านกระบวนการของอนุมูลอิสระ แต่จะเกิดปฏิกิริยาการเติมในพันธะคู่ เกิด endoperoxides ซึ่งจะถูก reduced ไปเป็นอนุมูลอิสระ alkoxyl ซึ่งจะนำไปสู่การเกิด radical chain reactions เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของปฏิกิริยาและกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นกระบวนการวิเคราะห์วิธีเดียวไม่สามารถที่จะหาแหล่งอนุมูลอิสระหรือสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างถูกต้องในระบบผสมหนึ่งๆ

สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายประเภททั้งที่พบในร่างกายซึ่งอาจเป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ และที่พบในอาหาร สำหรับงานวิจัยนี้สนใจศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระประเภท สารประกอบฟีนอล

1.1 สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) [2]

สารประกอบฟีนอล เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลติดอยู่เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ๆที่ตำแหน่ง ortho, meta หรือ para ได้อีก การแทนที่ๆที่ตำแหน่งต่างๆทำให้มีโครงสร้างแตกต่างกันออกไป สารประกอบฟีนอลตัวพื้นฐานคือ phenol ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ ดังรูป 1.1 มีมวลโมเลกุล 94.11 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี เมื่อโดนอากาศจะมีสีชมพูอ่อนๆ จุดหลอมเหลว 40.85°C จุดเดือด 182°C สารละลายของ phenol เป็นกรดอ่อน โดยมีค่า pKa 10.0 ฟีนอล ละลายได้ในกลีเซอรอล คาร์บอนไดซัลไฟด์ อัลกอฮอล์ อีเธอร์ และ คลอโรฟอร์ม ตัวอย่างสารประกอบฟีนอลแสดงดังตารางที่ 1.1

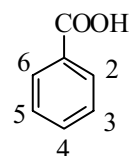


รูปที่ 1.1 โครงสร้างพื้นฐานฟีนอล

ตารางที่ 1.1 ประเภทต่างๆของสารประกอบฟีนอล [2]

สารประกอบฟีนอล	โครงสร้างพื้นฐาน
----------------	------------------

Simple Polyphenols



benzoic acid

o-hydroxybenzoic acid (2-OH)

m-hydroxybenzoic acid (3-OH)

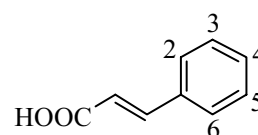
p- hydroxybenzoic acid (4-OH)

protocatechuic acid (3,4-OH)

β -resorcylic acid (2,4-OH)

vanillic acid (4-OH, 3-OCH₃)

gallic acid (3,4,5-OH)



cinnamic acid

o- cinnamic acid (2-OH)

m- cinnamic acid (3-OH)

p- cinnamic acid (4-OH)

caffeic acid (3,4-OH)

chlorogenic acid (caffeoylquinic acid)

feruic acid (4-OH, 3-OCH₃)

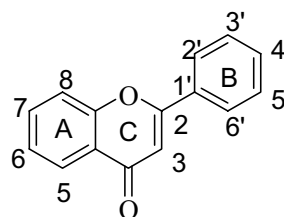
isoferulic acid (3-OH, 4-OCH₃)

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สารประกอบฟีนอล

โครงสร้างพื้นฐาน

Flavonoids



flavones

flavone (none)

7,4'-dihydroxyflavone

7,3',4'-trihydroxyflavone

chrysin (5,7-OH)

genkwanin (5,4'-OH, 7-OCH₃)

baicalein (5,6,7-OH)

baicalein-7-*O*-glucuronide (baicalin)

apigenin (5,7,4'-OH)

apigenin-6-*C*-glucoside (isovitexin)

apigenin-7-*O*-glucoside (apigetrin)

apigenin-8-*C*-glucoside (vitexin)

vitexin-2''-*O*-rhamnoside

luteolin (5,7,3',4'-OH)

luteolin-6-*C*-glucoside (homoorientin)

luteolin-7-*O*-glucoside

luteolin-8-*C*-glucoside (orientin)

luteolin-3',7-di-*O*-glucoside

luteolin-4'-*O*-glucoside

diosmetin (5,7,3'-OH, 4'-OCH₃)

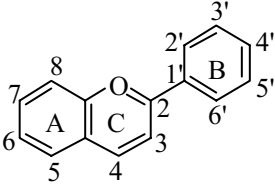
diosmetin-7-*O*-rhamnoside (diosmin)

chrysoeriol (5,7,4'-OH, 3'-OCH₃)

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สารประกอบฟีนอล	โครงสร้างพื้นฐาน
5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone	
tangeretin (5,6,7,8,4'-OCH ₃)	
gardenin A (5,6,7,8,3',4',5'-OCH ₃)	
sinensetin (5,6,7,3',4'-OCH ₃)	
flavonols	
flavonol (3-OH)	
galangin (3,5,7-OH)	
datiscetin (3,5,7,2'-OH)	
kaempferol (3,5,7,4'-OH)	
kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside (astragalin)	
kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	
kaempferol-3- <i>O</i> -neohesperidoside	
morin (3,5,7,2',4'-OH)	
quercetin (3,5,7,3',4'-OH)	
quercetin-3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrin)	
quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutin)	
quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside (quercitrin)	
robinetin (3,7,3',4',5'-OH)	
isorhamnetin (3,5,7,4'-OH, 3'-OCH ₃)	
tamarixetin (3,5,7,3'-OH, 4'-OCH ₃)	
quercetagenin (3,5,6,7,3',4'-OH)	
myricetin (3,5,7,3',4',5'-OH)	
myricetin-3- <i>O</i> -rhamnoside (myricitrin)	

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

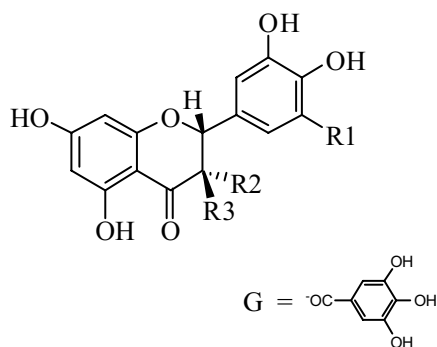
สารประกอบฟีนอล	โครงสร้างพื้นฐาน
flavanones (2-3 is saturated)	
naringenin (5,7,4'-OH)	
naringenin-7- <i>O</i> -rutinoside (naringin)	
eriodictyol (5,7,3',4'-OH)	
hesperetin (5,7,3'-OH, 4'-OCH ₃)	
hesperetin-7- <i>O</i> -rutinoside (hesperidin)	
hesperetin-7- <i>O</i> -rutinoside (hesperidin)	
(+)-taxifolin (3,5,7,3',4'-OH)	
isoflavones (B-ring binds to 3 position)	
daidzein (7,4'-OH)	
daidzein-7- <i>O</i> -glucoside (daidzin)	
daidzein-7- <i>C</i> -glucoside (puerarin)	
genistein (5,7,4'-OH)	
genistein-7- <i>O</i> -glucoside (genistin)	
glycitein (7,4'-OH, 6-OCH ₃)	
glycitein -7- <i>O</i> -glucoside (glycitin)	
biochanin A (5,7-OH, 4'-OCH ₃)	
formononetin (7-OH, 4'-OCH ₃)	
	Anthocyanins
	
pelargonidin (3,5,7,4'-OH)	
cyaniding (3,5,7,3',4'-OH)	
cyaniding-3- <i>O</i> -rutinoside	
delphinidin (3,5,7,3',4',5'-OH)	

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สารประกอบฟีนอล

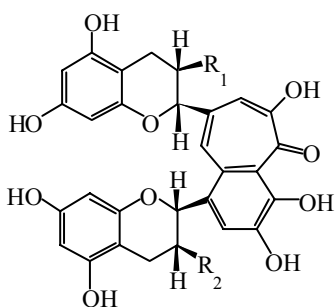
โครงสร้างพื้นฐาน

Catechins and Theaflavins



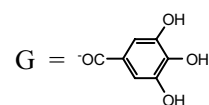
catechins

- (+)-catechin ($R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$)
- (-)-gallocatechin ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$)
- (-)-catechin gallate ($R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OG}$)
- (-)-gallocatechin gallate ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OG}$)
- (-)-epicatechin ($R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$)
- (-)-epigallocatechin ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$)
- (-)-epicatechin gallate ($R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OG}, R_3 = \text{H}$)
- (-)-epigallocatechin gallate ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OG}, R_3 = \text{H}$)



theaflavins

- theaflavine ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}$)
- theaflavin-3-galate ($R_1 = \text{OG}, R_2 = \text{OH}$)
- theaflavin-3'-galate ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OG}$)
- theaflavin-3,3'-digalate ($R_1 = \text{OG}, R_2 = \text{OG}$)

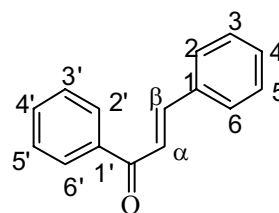


ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

สารประกอบฟีนอล

โครงสร้างพื้นฐาน

Chalcones



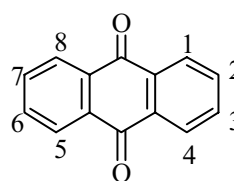
chalcone(none)

isoliquiritigenin (4,2',4'-OH)

butein (3,4,2',4'-OH)

phloretin (α - β bond is saturated, 4,2',4',6'-OH)

Anthraquinones



anthraquinone (none)

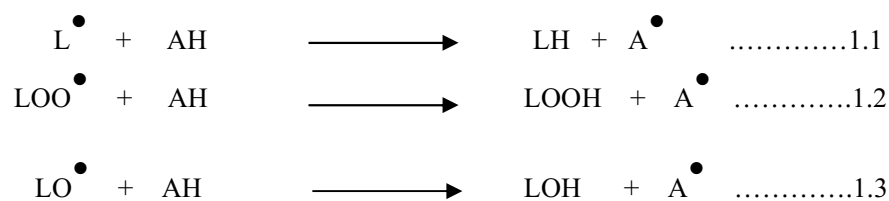
alizarin (1,2-OH)

purpurin (1,2,4-OH)

emodin (1,6,8-OH, 3-CH₃)

rhein (1,8-OH, 3-COOH)

คุณสมบัติที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant) และสารต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagens) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (Free radical) และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างการเกิดออกซิเดชันของ peroxy และ alkoxy radical [3] ดังปฏิกิริยา 1.1 ถึง 1.3



เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป

1.2 ข้อมูลทั่วไปของพิกุล

พิกุล มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Mimusops elengi* Linn. อยู่ในวงศ์ Sapotaceae ชื่อสามัญคือ Bullet Wood, Spanish Cherry หรือ Tanjong Tree ชื่ออื่นๆ เช่น ภาคเหนือ เรียก แก้ว ภาคใต้และภาคกลาง เรียก พิกุล ถิ่นกำเนิดอยู่ที่ อินเดีย พม่า ศรีลังกา พิกุลเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ก่อนข้างโตช้า ลำต้นเหนือดินตั้งตรงได้เอง ผิวลำต้นเป็นเส้น ต้นแก่สีน้ำตาลอมเทา มีน้ำยางสีขาวขุ่น เรือนยอดแน่นทึบ เขียวเข้ม แผ่กว้างเป็นพุ่มกลม ใบเป็นใบเดี่ยว ใบอ่อนสีเขียวอมเหลือง ใบแก่เขียวเข้ม ผิวใบมันวาว รูปใบขอบขนาน ปลายแหลมถึง โคนใบแหลม ใบเรียงสลับเวียนกัน ดอกเป็นดอกเดี่ยว ออกดอกตามซอกใบ กลีบเลี้ยงติดกัน 8 กลีบ สีขาวปนเหลือง กลีบดอกติดกัน 24 กลีบ ดอกสีขาวปนเหลือง มีกลิ่นหอม ผลเป็นรูปไข่ กว้าง 5 เซนติเมตร ยาว 5 - 3 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว ผลสุกมีสีแดงอมส้ม เนื้อสีเหลือง รสหวานอมฝาด เมล็ดแข็งมีลักษณะแบนรี ขนาด 5 เซนติเมตร 1 ผลมีเพียง 1 เมล็ด ดอกและผลของพิกุลแสดงดังรูป 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ การขยายพันธุ์ทำโดยการเพาะเมล็ด บริเวณที่พบขึ้นประปรายในป่าดงดิบทางภาคใต้ ภาคกลางและภาคตะวันออกของไทย



รูปที่ 1.2 ดอกพิกุล



รูปที่ 1.3 ผลพิกุล

สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา

เปลือกต้น รสฝาด ต้มเอาน้ำอมเป็นยาแก้ปวดปาก รักษาโรคเกี่ยวกับเหงือกและฟัน

แก่น รสขมฝืด บำรุงโลหิต แก้ไข้

กระพี้ รสเมาเบื่อ แก้เกลื้อน

ราก รสขมฝืด บำรุงโลหิต แก้เสมหะ

ใบ รสเบื่อฝาดฆ่าเชื้อกามโรค แก้หิด

เมล็ด รสฝืด คั่วให้ละเอียดทำเป็นยาเม็ดสำหรับสวนเวลาท้องผูก น้ำมันที่กลั่นได้จากเมล็ด ใช้ทำอาหาร ผสมยาและจุดไฟ

ดอกแห้ง รสหอมสุขุม ปั่นทำเป็นยานัตถุ์ ใช้เป็นยาสำหรับรักษาไข้ ปวดหัว เจ็บในคอ ไหล่และส่วนอื่นๆ ของร่างกาย แก้ร้อนใน

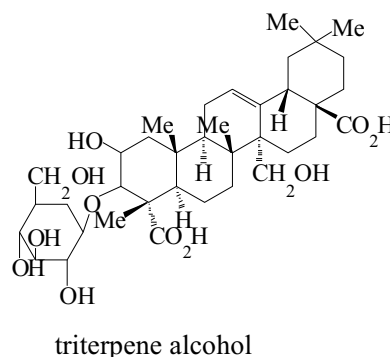
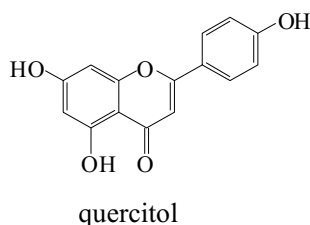
ส่วนที่ใช้เป็นอาหาร

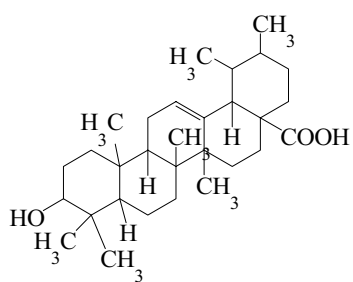
ผล เมื่อแก่จัดและสุกรับประทานได้ มีรสหวาน

1.3 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดผลพิกุล

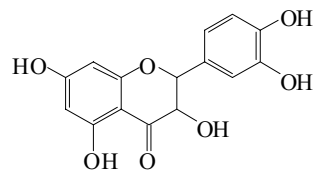
มีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากส่วนต่างๆของพิกุลตั้งแต่ปี 1967 จนถึงปัจจุบันโดยมีการรายงานแล้วทั้งสิ้น 11 ตัว ได้แก่ quercitol, triterpene alcohol, ursolic acid, dihydroquercetin, quercetin, mimusopin, mimusopsin, pentacyclic triterpenes, mimusopgenone, mimugenone และ mimusin

ในปี ค.ศ. 1976 Misra และ Mitra [4] ได้ทำการสกัดสารจากผลและเมล็ดของพิกุลโดยใช้ ethanol พบว่ามี quercitol, ursolic acid, triterpene alcohol, dihydroquercetin และ quercetin เป็นองค์ประกอบ มีสูตรโครงสร้างคือ

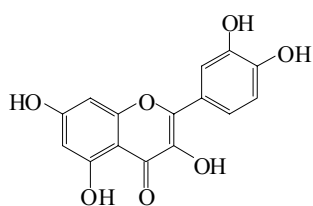




ursolic acid

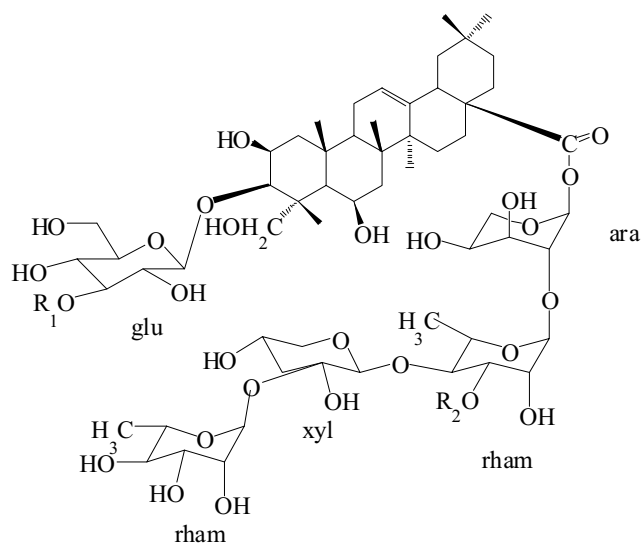


dihydroquercetin



quercetin

ในปี ค.ศ. 1995 Sahu และคณะ [5] รายงานการพบ mimusopin และ mimusopsin จากสารสกัด
เมล็ดของพิกุลมีสูตรโครงสร้างคือ



1 $R_1 = H$ $R_2 = \text{rham}$ (mimusopin)

2 $R_1 = \text{glu}$ $R_2 = H$ (mimusopsin)

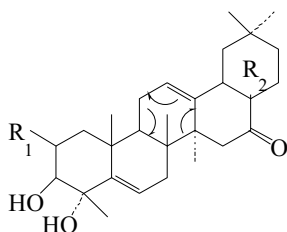
glu = glucose

ara = arabinose

xyl = xylose

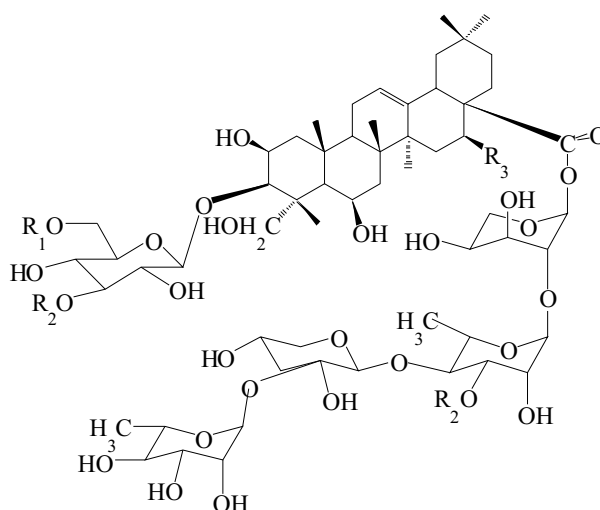
rhm = rhamnose

ในปี ค.ศ. 1995 Sen และคณะ [6] ได้ค้นพบ pentacyclic triterpenes, mimusopgenone และ mimugenone จากสารสกัดเมล็ดพิกุล สูตรโครงสร้างคือ



- | | | | |
|---|-------------------|---------------------|-----------------|
| 1 | $R_1 = \text{OH}$ | $R_2 = \text{H}$ | (mimusopgenone) |
| 2 | $R_1 = \text{H}$ | $R_2 = \text{CH}_3$ | (mimugenone) |

ในปี ค.ศ. 1997 Sahu และคณะ [7] ได้ค้นพบ mimusin จากสารสกัดเมล็ดของพิกุล มีสูตรโครงสร้างคือ



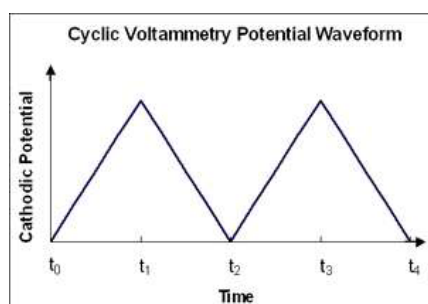
- | | | | |
|---|--------------------|--------------------|---|
| 1 | $R_1 = \text{Glc}$ | $R_2 = \text{H}$ | $R_3 = \text{H}$ (new minor saponin and mimusin) |
| 2 | $R_1 = \text{H}$ | $R_2 = \text{Glc}$ | $R_3 = \text{H}$ (mimusopsin) |
| 3 | $R_1 = \text{H}$ | $R_2 = \text{H}$ | $R_3 = \text{H}$ (Mi-saponin) |
| 4 | $R_1 = \text{H}$ | $R_2 = \text{H}$ | $R_3 = \text{OH}$ (16 α -hydroxy Mi-saponin A) |

1.4 วิธีการวิเคราะห์ Antioxidant โดยเทคนิค voltammetry

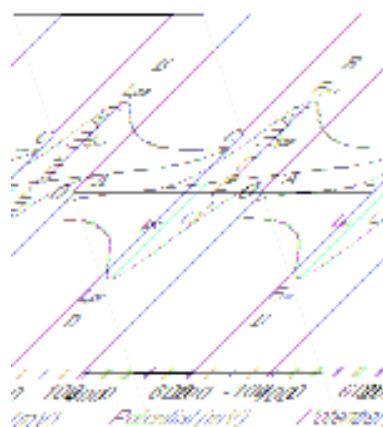
เทคนิค cyclic voltammetry ได้ถูกนำมาใช้ในการหา antioxidant capacity ของสารประกอบฟีนอล โดยอาศัยปฏิกิริยา redox ที่ขั้วของสารสกัดจากพืช และเครื่องดัดแปลงต่างๆ [8] [9] และ [10] voltammogram ซึ่งเป็นการพล็อตระหว่างค่ากระแสกับศักย์ไฟฟ้า นั้นได้จากการสแกนศักย์ไฟฟ้าของ working electrode กับเวลา ทั้งปฏิกิริยาไปข้างหน้าและย้อนกลับ ตำแหน่งของ peak จากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นตำแหน่งของค่ากระแสไฟฟ้าซึ่งถูกจำกัดด้วยการแพร่ diffusion limited สาร antioxidant ที่จะเป็น reducing agent ที่ค่านั้นจะเกิดออกซิเดชันที่ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้าต่ำ โดยลำดับของค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดออกซิเดชัน (oxidation potential) สามารถใช้เปรียบเทียบความสามารถของ antioxidant ต่างชนิดกันได้

1.4.1. Cyclic voltammetry (CV)

Cyclic voltammetry (CV) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าที่อาศัยการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วใช้งาน (working electrode, WE) ลักษณะเป็นวงจรเพื่อให้สารที่สนใจเกิดปฏิกิริยา oxidation และ reduction ที่ WE ในการให้ศักย์ไฟฟ้าที่ WE นั้นจะให้ไปทั้งทางด้าน positive scan และ negative scan เพื่อให้สารที่สนใจเกิดทั้งปฏิกิริยา oxidation และ reduction ในสารละลายที่หนึ่ง ลักษณะของ potential excitation signal และ response signal แสดงดังรูป 1.4



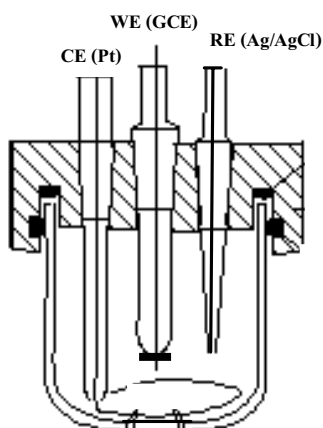
a.



b.

รูปที่ 1.4 (a) Potential excitation signal และ (b) Response signal ของเทคนิค cyclic voltammetry

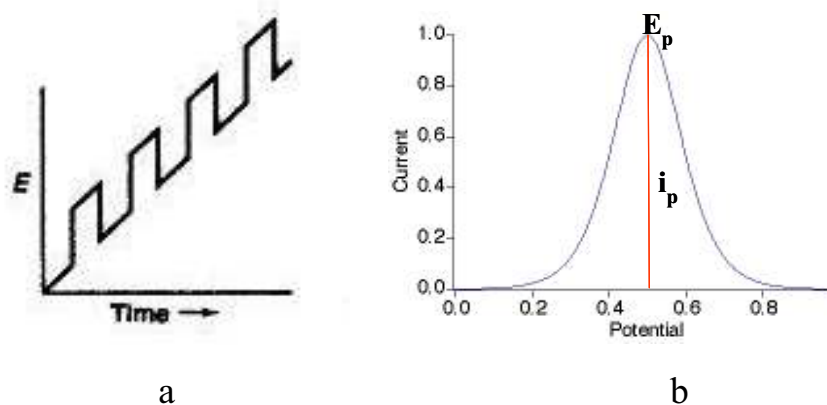
เทคนิค CV ใช้ไฟฟ้าที่มีด้วยกัน 3 ขั้วคือขั้วใช้งาน (working electrode WE) ขั้วอ้างอิง (reference electrode RE) และ ขั้วช่วย (counter electrode CE) ดังรูป 1.5



รูปที่ 1.5 เซลล์เคมีไฟฟ้าของเทคนิค CV

2. Differential pulse voltammetry (DPV)

Differential pulse voltammetry (DPV) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าที่อาศัยหลักการทำงานคล้ายกับเทคนิค CV จะต่างกันก็ตรงที่เทคนิค DPV การให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วใช้งานจะให้ในลักษณะที่เป็น pulse โดยจะวัดความแตกต่างของกระแสในช่วงก่อนให้ pulse และที่ปลายอายุของ pulse ลักษณะของ potential excitation signal และ response signal แสดงดังรูป 1.6



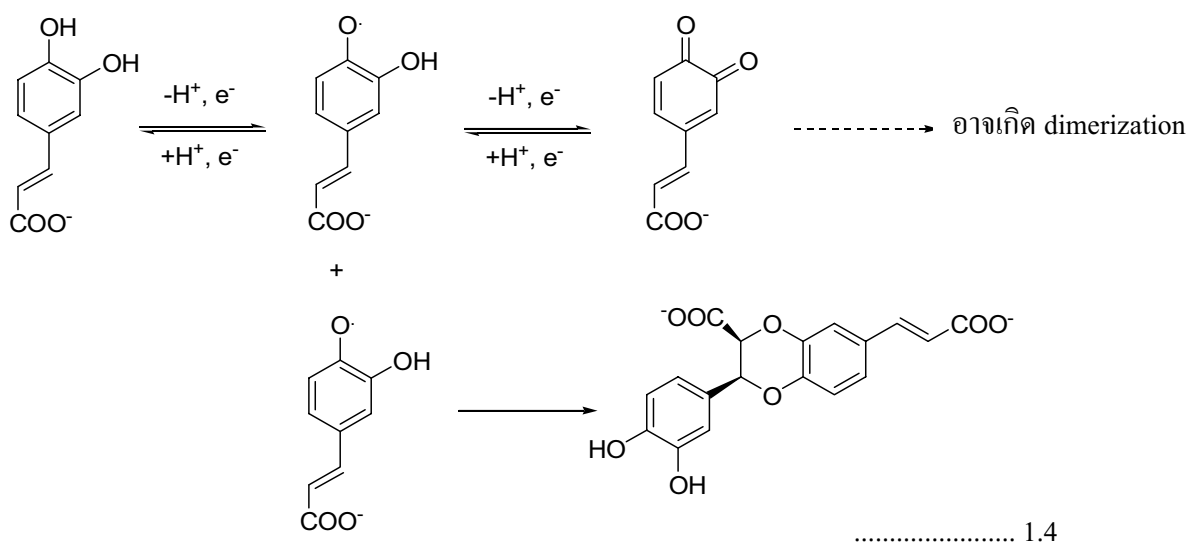
รูปที่ 1.6 (a) potential excitation signal และ (b) response signal ของเทคนิค DPV

3. ปฏิกิริยา oxidation ที่ผิวขั้วของสารมาตรฐาน antioxidant ที่ศึกษา

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารมาตรฐาน antioxidant จำนวน 6 ชนิดในการศึกษา คือ caffeic acid catechin catechol epigallocatechin gallate (EGCG) ascorbic acid และ gallic acid โดยรายงานการศึกษาปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้าของสารเหล่านี้ดังต่อไปนี้

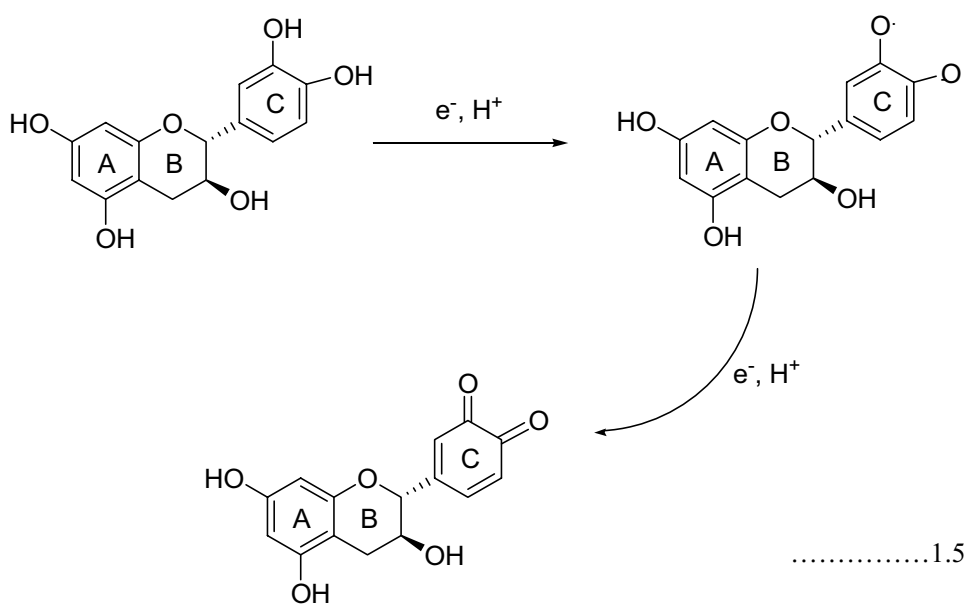
1. caffeic acid

ในปี ค.ศ.2002 Hotta และคณะ [11] ได้ศึกษาปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้าของ caffeic acid โดยใช้ cyclic voltammetry ขั้ว working electrode เป็น glassy carbon พบว่าปฏิกิริยาเป็น reversible reaction ในสถานะที่เป็นกรด ซึ่งปฏิกิริยาเป็น two-electron transfer โดยที่ caffeic ถูกออกซิไดซ์ไปเป็น quinone เมื่อสถานะเป็นเบสเพิ่มขึ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ caffeic acid จะเป็น irreversible chemical reaction ซึ่ง quinone อาจเกิดปฏิกิริยา dimerization ดังปฏิกิริยา 1.4



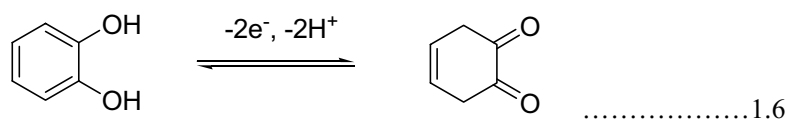
2. catechin

ในปี ค.ศ.2004 Janeiro และ Brett [12] ได้ศึกษาปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้าของ flavonoid (+)-catechin โดยใช้เทคนิค CV, DPV และ SWV ขั้ว working electrode เป็น glassy carbon พบว่าปฏิกิริยา electron transfer เกิดจากหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง ring C ซึ่งเกิดเป็นขึ้นสองขั้นตอนตรงตำแหน่ง catechol และ resorcinol group และพบว่า Ep จะขึ้นกับ pH ของสารละลาย supporting electrolyte อีกด้วย ดังปฏิกิริยา 1.5



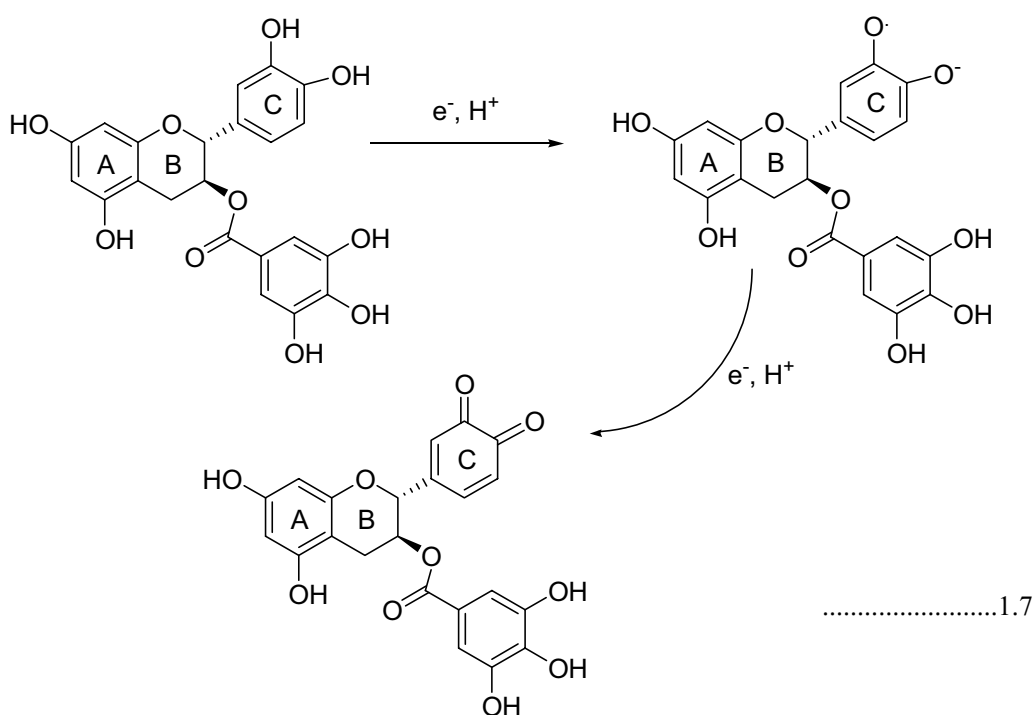
3. catechol

ในปี ค.ศ.2005 Davarani และคณะ [13] ได้ศึกษาปฏิกิริยา oxidation ที่ขั้วไฟฟ้าของ catechol ใน water:acetonitrile (90:1) ที่มี 0.2 mM acetate buffer pH 5.5 เป็น supporting electrolyte และใช้ขั้ว working electrode เป็น glassy carbon ปฏิกิริยาเป็น quasi-reversible two electron process ของ catechol ไปเป็น o-benzoquinone การเกิด hydroxylation หรือ dimerization reaction ช้ากว่า time scan ใน CV พบว่า Ep จะขึ้นกับ pH ของสารละลาย supporting electrolyte ในสารละลายที่มี pH สูงขึ้นและ scan rate ต่ำลงปฏิกิริยาจะเป็น irreversible ดังปฏิกิริยา 1.6



4. epigallocatechin gallate (EGCG)

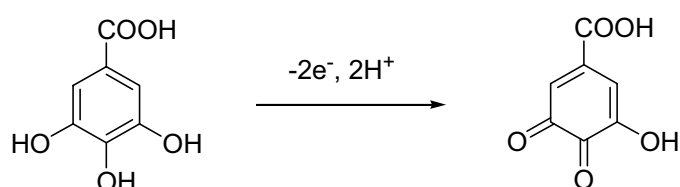
กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วของ EGCG จะเกิดทำนองเดียวกันกับของ catechin เนื่องจากมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน นั่นคือ ปฏิกิริยา electron transfer เกิดจากหมู่ hydroxyl ของ catechol และ resorcinol group ที่ตำแหน่ง ring C ดังปฏิกิริยา 1.7



5. gallic acid

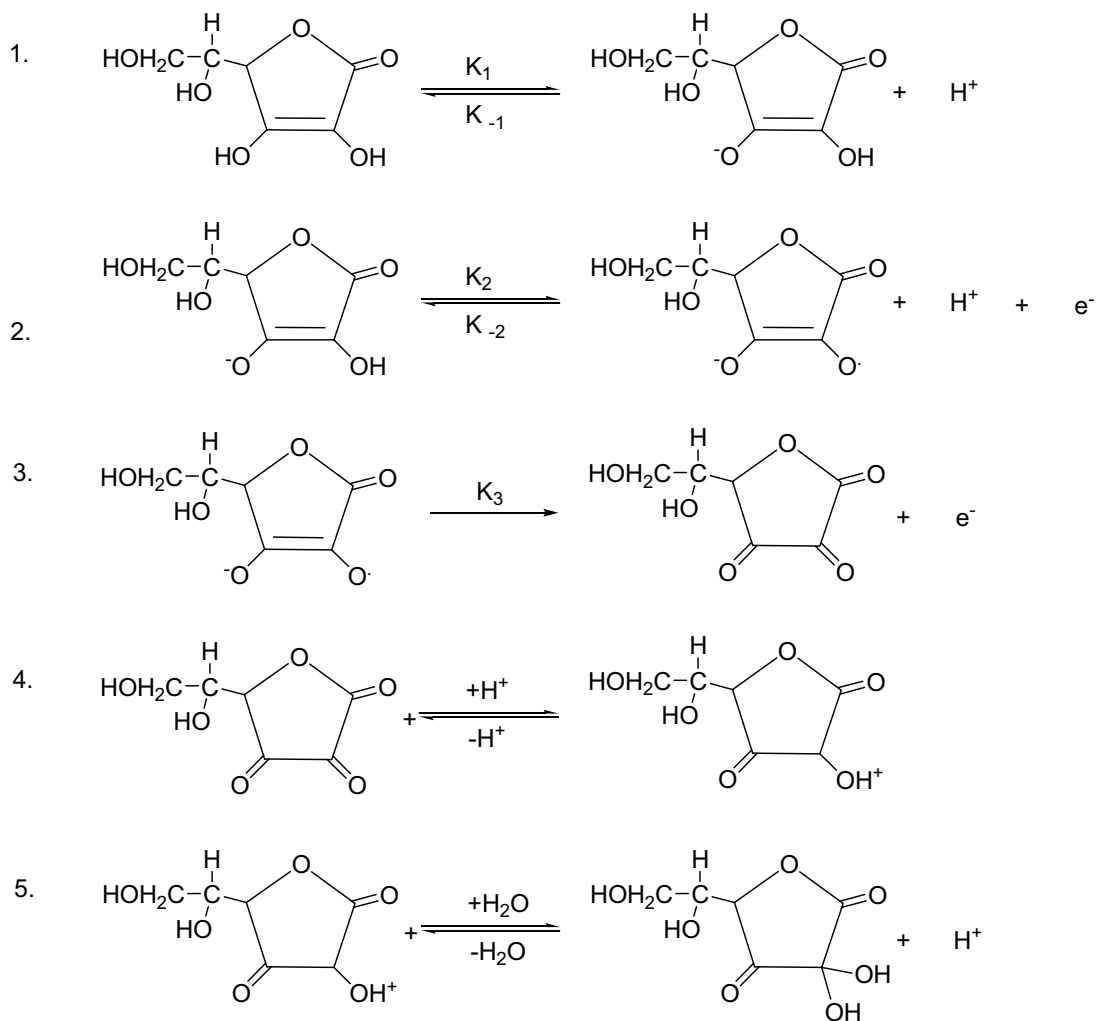
ในปี ค.ศ.2003 Shaolin Mu [14] ได้ศึกษาปฏิกิริยา oxidation ที่ขั้ว polyaniline film ของ gallic acid โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry ใน 0.2 M phosphate buffer pH 5.0 -6.6 พบว่าปฏิกิริยา oxidation ที่ผิวขั้วเกิดจาก hydroxyl ทั้งสองที่ต่อกับ double bond ของ gallic acid ซึ่ง Epa จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ gallic acid สูงขึ้น และจะมีค่าลดลงเมื่อ pH ของสารละลายลดลง ดังปฏิกิริยา

1.8



6. ascorbic acid

ในปี ค.ศ.1986 Hu และ Kuwana [15] ได้ศึกษา mechanism ของปฏิกิริยา oxidation ของ ascorbic acid บนขั้ว glassy carbon ที่ผ่าน และไม่ผ่าน pretreatment โดยวิธี vacuum heat treatment (VHT) ใน 0.1 M phosphate buffer pH 2.0 พบว่าปฏิกิริยา electron transfer เป็นปฏิกิริยา irreversible ดังปฏิกิริยา 1.9

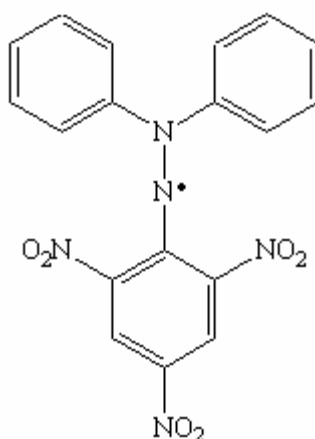


.....1.9

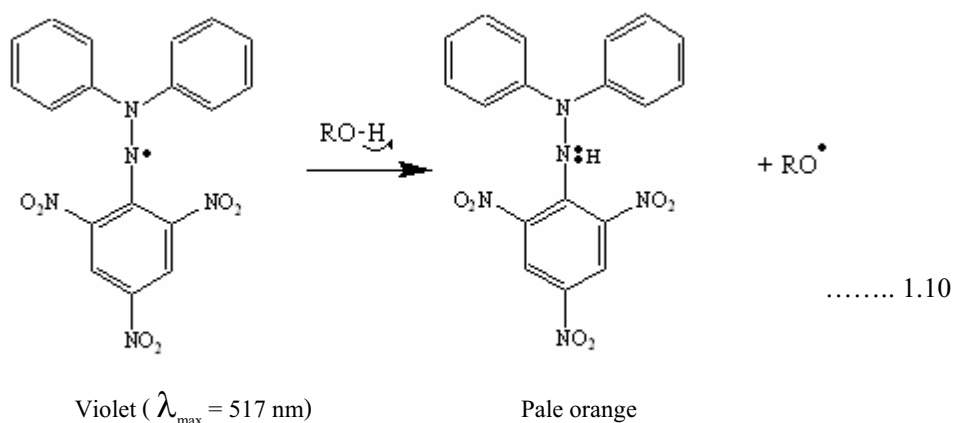
1.5 วิธีการวิเคราะห์ antioxidant activity โดยวิธี spectrometry

1.5.1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay : (DPPH assay) [16] [17]

DPPH assay เป็นวิธีการตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) ซึ่ง อาศัย 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็น free radical ที่มีสีม่วงและมีความเสถียรในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้จะมีสีม่วงแสดงดังรูป 1.7 ดูดกลืนแสงได้ดีที่ 517 nm โดย antioxidant (RH) หรือ radical species (R[•]) จะทำปฏิกิริยากับ DPPH[•] ซึ่ง DPPH[•] จะถูก reduce ด้วย antioxidant (RH) หรือ radical species (R[•]) กลายเป็น DPPH-H หรือ DPPH-R ดังปฏิกิริยา 1.10



รูปที่ 1.7 โครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)

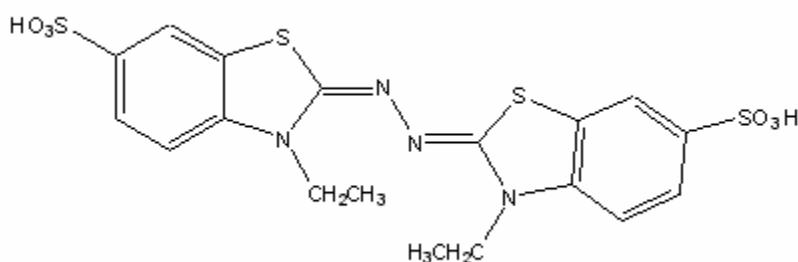


ผลจากปฏิกิริยาทำให้ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงของ DPPH[•] ลดลงกลายเป็นสารละลายสีเหลือง ถ้าตัวอย่างที่เราทดสอบ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง จะทำให้ปริมาณ DPPH[•] ลดลงได้มาก การรายงานผลจะแสดงเป็นค่า EC₅₀ ซึ่งหมายถึงปริมาณ antioxidant ที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50%

หรือใช้การเปรียบเทียบหาความสามารถในการเป็น antioxidant กับสารมาตรฐานเช่น gallic acid ข้อดีของ DPPH assay คือ เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง (accuracy) และ reproducibility ที่สูง โดยมีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์ antioxidant activity ในบางตัวอย่างเช่น serum เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ (alcoholic reaction) ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

1.5.2. 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical - scavenging assay : (ABTS assay) [18] [19]

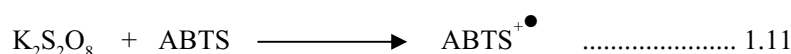
ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ซึ่งเมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายใสไม่มีสี โครงสร้างของ ABTS แสดงดังรูปที่ 1.8 เมื่อทำให้เกิดเป็น stable radical ในตัวทำละลายน้ำ สารละลายจะมีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 nm



รูปที่ 1.8 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)

การทำให้เกิด ABTS radical สามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา

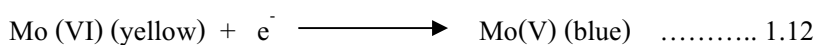
1. Enzyme reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิไดส์ให้เกิด ABTS radical เช่น เอนไซม์ peroxidase, myoglobin เป็นต้น
2. Chemical reaction คือ เช่น manganese dioxide, potassium persulfate เป็นต้น และในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ potassium persulfate เป็นตัวที่ทำให้เกิด ABTS radical ดังปฏิกิริยา 1.11



ถ้าตัวอย่าง antioxidant มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง ความเข้มของสารละลายสีเขียวก็จะลดลง โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) หมายถึง ปริมาณ antioxidant ที่ทำให้ความเข้มข้นของ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ลดลง 50% หรือรายงานผลโดยเปรียบเทียบหาความสามารถในการเป็น antioxidant กับสารมาตรฐานเช่น gallic acid เป็น GAE (gallic acid equivalent) หรือ trolox เป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)

1.6 การวิเคราะห์ total phenolics โดยวิธี Folin-Denis Assay [20]

Folin-Denis Assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการหาปริมาณ Total phenolic compounds ในสารสกัดจากพืช โดยอาศัยปฏิกิริยาของ phosphomolybdic-phosphotungstic acid (Folin – Denis reagent) ที่มี NaHCO_3 อยู่ด้วย เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับ phenolic compounds ได้มีการพัฒนาวิธีนี้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทต่างๆ และได้เป็นวิธีสำหรับวิเคราะห์ total phenolics โดย Association of Official Analytical Chemists (AOAC) method ปฏิกิริยาของ Folin – Denis reagent กับสารประกอบ phenolic compound แสดงดังปฏิกิริยา 1.12 ซึ่งเป็นปฏิกิริยารีดักชันของ Mo(VI) ไปเป็น Mo(V) แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm และวิธีนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว



1.6 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. สกัดแยกสารประกอบ phenolic acid ออกจากผลพิกุลเป็น crude extract, free phenolic acids (F1), soluble phenolic acid ester (F2) และ insoluble-bound phenolic acid (F3)
2. ศึกษาสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากผลพิกุลโดยใช้เทคนิค chromatography
3. ศึกษา antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุลโดยใช้เทคนิค voltammetry
4. ศึกษา antioxidant activity โดยใช้เทคนิค DPPH assay
5. ศึกษา antioxidant activity โดยใช้เทคนิค ABTS assay
6. หาปริมาณ total phenolic compounds ในสารสกัดจากผลพิกุล โดยใช้เทคนิค Folin-Denis assay

บทที่ 2

สารเคมี และเครื่องมือ

2.1 เครื่องมือ / อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1.1 AUTOLAB instrument PGSTAT 20 พร้อมโปรแกรม GPES for window version 4.5
- 2.1.2 UV/VIS spectrometer Lambda 35 (Perkin Elmer)
- 2.1.3 Spectrophotometer U-3300 (Hitachi)
- 2.1.4 Freez dryer
- 2.1.5 RC-5 superspeed refrigerated centrifuge
- 2.1.6 Vortex mixer
- 2.1.7 Rotary Evaporator Rotavapor R-114 (Buchi)
- 2.1.8 Magnetic stirrer MR 3001 (Heidolph)
- 2.1.9 pH meter Delta 320 (Mettler)
- 2.1.10 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- 2.1.11 Quartz cell คู่
- 2.1.12 ครกและโม่บดยา
- 2.1.13 Silica gel TLC plate (Fluka)

2.2 สารเคมี

ตารางที่ 2.1 รายชื่อสารเคมี บริษัทผู้ผลิต และเกรด

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	เกรด
ABTS	Fluka	puram
Acetic acid	B.D.H.	Anala R
Acetone	B.D.H.	Anala R
Ascorbic acid	Aldrich	99% HPLC
Ammonia	B.D.H.	Anala R
Ammonium chloride	Fluka	puram
Caffeic acid	Fluka	purum
Catechol	Fluka	purum
(+)-Catechin hydrate	Fluka	96% HPLC
Diethyl ether	B.D.H.	Anala R
DPPH	Fluka	purum
Disodium hydrogen phosphate	Fluka	purum
(-)-Epigallocatechin gallate	sigma	80% HPLC
Ethanol	โรงงานสุราอยุธยา	กลั่นซ้ำ 1 ครั้ง
Ethyl acetate	B.D.H.	Anala R
Gallic acid-1-hydrate	Fluka	purum
Hexane	Lab-Scan	AR
Hydrochloric acid	Merck	Pro analysis
Iron(III)chloride	Fluka	purum
Methanol	B.D.H.	Anala R
Orthophosphoric acid	B.D.H.	Anala R
Phosphomolybdic acid hydrate	Aldrich	purum
Potassium persulfate	Fluka	purum
Quercetin	Fluka	98% HPLC
Sodium dihydrogen phosphate	Fluka	purum

ตารางที่ 2.1 ต่อ

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	เกรด
Sodium hydroxide	Fluka	purum
Sodium tungstate dihydrous	Fluka	puriss
Trolox	Aldrich	97% HPLC

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 สารละลาย 0.1 M acetate buffer pH 4.5

1. ปิเปต acetic acid 2.85 ml ใส่ขวดปริมาตรขนาด 250 ml ปรับปริมาตรด้วย deionized water
2. เติม NaOH 1.00 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 4.5 ได้สารละลาย acetate buffer pH 4.5 เข้มข้น 0.1 M

2.3.2 สารละลาย 50 mM phosphate buffer pH7.0

1. ชั่ง Na_2HPO_4 8.90 กรัม ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml deionized water
2. ชั่ง NaH_2PO_4 3.90 กรัม ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 500 ml deionized water
3. ผสมสารละลาย Na_2HPO_4 650 ml กับ NaH_2PO_4 250 ml ปรับ pH เป็น 7.0 ได้สารละลาย phosphate buffer pH 7.0 เข้มข้น 50 mM

2.3.3 สารละลาย 0.1 M $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer pH 9.0

1. ปิเปต NH_3 3.6 ml ใส่ขวดปริมาตรขนาด 250 ml ปรับปริมาตรด้วย deionized water
2. ชั่ง NH_4Cl 2.67 กรัม ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 250 ml deionized water
3. ผสมสารละลาย NH_3 200 ml กับ NH_4Cl 200 ml ปรับ pH เป็น 9.0 ได้สารละลาย $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer pH 9.0 เข้มข้น 0.1 M

2.3.4 สารละลาย 0.1 M NaHCO_3

- ชั่ง NaHCO_3 2.1 กรัม ละลายใน deionized water 250 ml

2.3.5 สารละลาย 2% FeCl_3 ใน ethanol

- ชั่ง FeCl_3 2.0 กรัม ละลายใน ethanol 100 ml

2.4 ตัวอย่าง

ตัวอย่างผลพิกุลเก็บจากบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ทำการเก็บผลเป็นสามระยะคือ ผลอ่อนลักษณะเปลือกสีเขียว เนื้อในสีขาว และเมล็ดสีขาว อายุของผลประมาณ 90 วัน หลังการผสมเกสรจนดอกร่วงหลุดกลายเป็นผลแล้ว และผลแก่ลักษณะเปลือกนอกเขียว เนื้อในสีเหลือง และเมล็ดสีดำ อายุของผลประมาณ 120 วัน และผลสุกลักษณะเปลือกสีเหลืองแดง เนื้อในสีแดง เมล็ดสีดำ

บทที่ 3

การทดลองและผลการทดลอง

3.1 ขั้นตอนการสกัดผลพิกุล

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างผลพิกุลเพื่อเก็บในรูปแบบ freeze dried sample

นำตัวอย่างผลพิกุลมาล้างให้สะอาด ผ่านน้ำเมล็ดออก นำไปแช่แข็งใน liquid nitrogen ก่อนบรรจุภาชนะเข้าเครื่อง freeze dryer เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติก และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4°C

3.1.2 การสกัดแยกสาร antioxidant จากผลพิกุลเป็น crude extract

ชั่งตัวอย่างผลพิกุลแห้งที่ปั่นละเอียด 10.00 กรัมใส่ลงในโกร่งบดสาร เติม 70% Methanol : 70% Acetone (1:1) ลงไป 50 mL บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายใส่หลอดแล้วเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 7000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนของ supernatant ออกจาก residue นำส่วนของ residue มาทำการสกัดด้วย 70% Methanol : 70% Acetone (1:1) ครั้งละ 30 mL อีก 4 ครั้งแยกเก็บส่วนของ supernatant รวมกับส่วนของ supernatant ที่สกัดได้จากครั้งที่ 1 เป็น crude extract

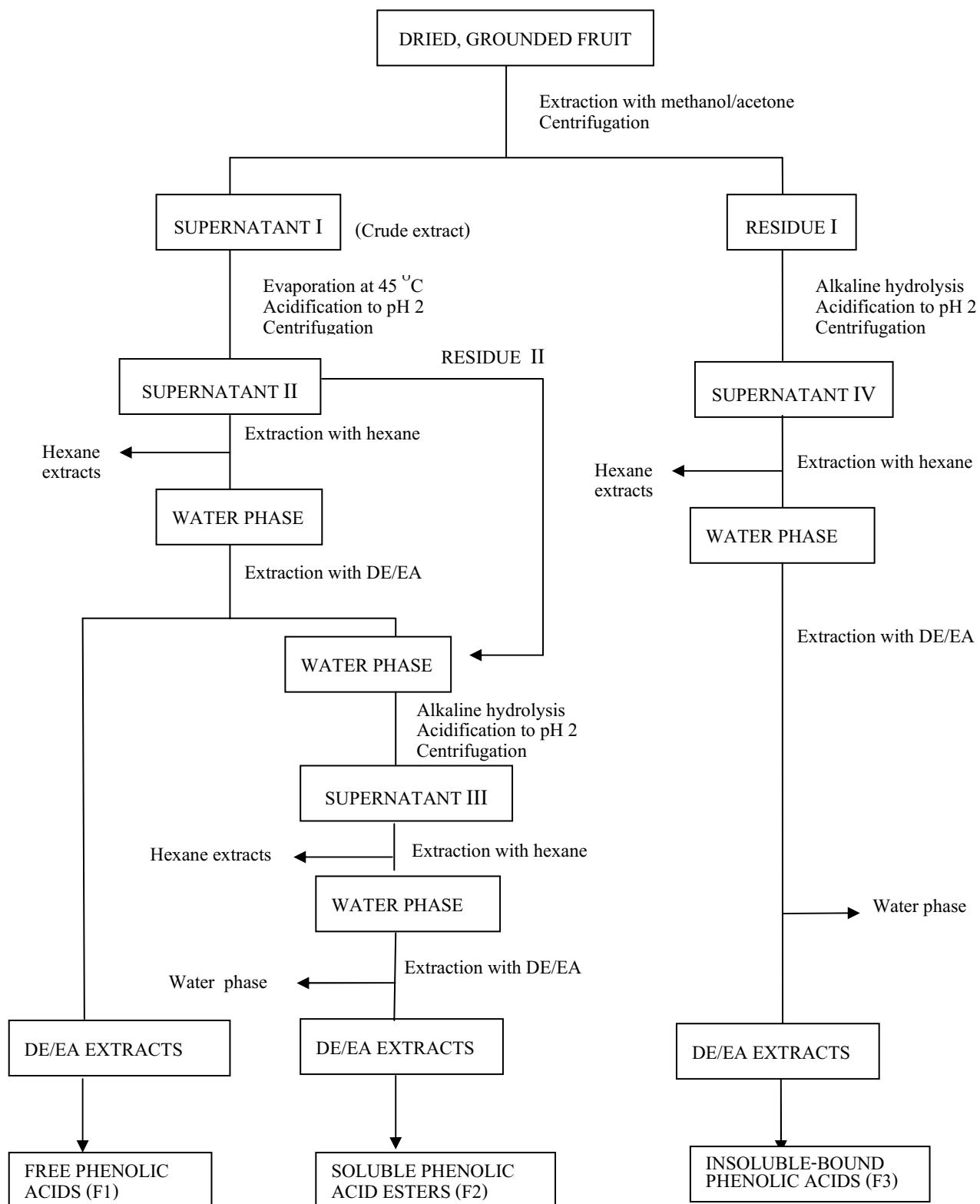
3.1.3 การสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลจากผลพิกุล

เตรียม crude extract ตามข้อ 3.1.2 ได้เป็น supernatant I และ residue I แล้วนำไปสกัดให้อยู่ในรูปแบบ free phenolic acids (F1) soluble phenolic acid esters (F2) และ insoluble-bound phenolic acids (F3) ดัดแปลงจากวิธีของ Krygier, K. [21] ตามผังในรูปที่ 3.1 ดังรายละเอียดต่อไปนี้

นำส่วน supernatant I ไประเหยที่ 45°C ให้เหลือปริมาตรประมาณ 10 mL โดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 2 โดยใช้ 6 M HCl นำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 7000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บส่วนของ supernatant II และ residue II นำส่วนของ supernatant II (ชั้นน้ำ) ไปสกัดโดยใช้ hexane ครั้งละ 30 mL จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัด fatty acid เก็บชั้นน้ำไปสกัดต่อโดยใช้ diethyl ether (DE) : ethyl acetate (EA) (1:1) ครั้งละ 20 mL จำนวน 6 ครั้งเก็บชั้นของ DE-EA เติม anhydrous Na_2SO_4 กรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำไประเหยแห้งที่ 30°C จนน้ำหนักคงที่ ได้เป็น free phenolic acids fraction (F1)

ส่วนชั้นน้ำจะนำไปรวมกับส่วนของ residue II แล้วนำไปทำ alkaline hydrolysis โดยใช้ 4 M NaOH จำนวน 20 mL หุ้มภาชนะด้วย aluminium foil ทำการกวนสารละลายด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องซึ่ง ester จะถูก hydrolyzed แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยทำให้สารละลายเป็นกรด มี pH เท่ากับ 2 ด้วย 6 M HCl แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 7000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บส่วนของ supernatant III นำส่วนของ supernatant III (ชั้นน้ำ) ไปสกัดต่อตามขั้นตอนเช่นเดียวกับ supernatant II จะได้เป็น soluble phenolic acid esters fraction (F2)

สำหรับส่วนของ residue I ที่เก็บจากการสกัดด้วย 70% Methanol : 70% Acetone (1:1) ในขั้นตอนที่ 1 นั้นก็จะนำมาทำ alkaline hydrolysis ด้วย 4 M NaOH เช่นเดียวกับชั้นน้ำของ residue II และแยกเก็บเป็นส่วนของ supernatant IV ทำการสกัดต่อเช่นเดียวกันกับ supernatant III จะได้ออกมาเป็น insoluble-bound phenolic acids fraction (F3) ตัวอย่างผลพิกุลที่แบ่งเป็น 3 ระยะ นำแต่ละระยะมาทำการสกัดและแยกเป็น fraction ตามผังการสกัด แต่ละ fraction (F1, F2 และ F3) ได้จากการสกัดตัวอย่าง 3 ครั้ง แล้วนำสารสกัดแต่ละครั้งมารวมกัน จากนั้นนำ F1, F2 และ F3 ไปละลายด้วย methanol โดยปรับปริมาตรของ F1 ให้เป็น 10 mL ส่วน F2 และ F3 จะปรับให้มีปริมาตรเป็น 25 mL ในขนาดปริมาตรสำหรับนำไปวิเคราะห์ antioxidant ต่อไป น้ำหนักของสารสกัด % yield ซึ่งเป็นร้อยละของน้ำหนักสารที่สกัดได้น้ำหนักแห้งสารตัวอย่างตั้งต้นที่ใช้ และความเข้มข้นของสารสกัด ที่ได้ของ crude extract และแต่ละ fraction แสดงดังตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ฟังก์ชันการสกัดสารประกอบฟีนอล

ผลการทดลอง

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักสารสกัดและ % yield

ผลพิกุลระยะ	น้ำหนักแห้งสารสกัด(g)	% yield
ผลอ่อน	10.0008	-
ผลแก่จัด	10.0001	-
ผลสุก	10.0023	-
ผลอ่อน		
F1	0.1091	0.364
F2	1.0583	3.527
F3	0.1764	0.588
ผลแก่จัด		
F1	0.0355	0.118
F2	0.8180	2.726
F3	0.2393	0.797
ผลสุก		
F1	0.0293	0.098
F2	0.4839	1.613
F3	2.6768	8.290

$$\% \text{ yield} = \text{g} / 100\text{g dried weight sample}$$

3.2 การศึกษาสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากผลพิกุลด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) และการหาปริมาณ antioxidant ในสารสกัดผลพิกุลอ่อนด้วยเทคนิค HPLC

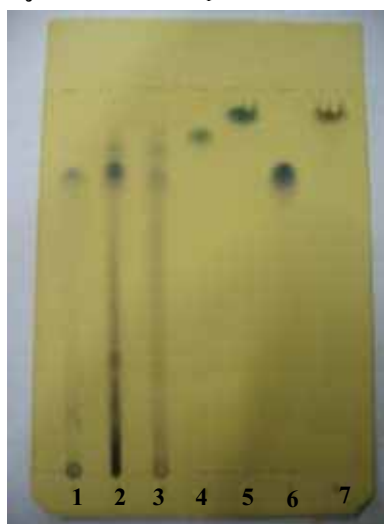
การศึกษา antioxidant ในสารสกัดจากผลพิกุลด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ stationary phase เป็น silica gel และใช้ mobile phase เป็น ethyl acetate/methanol/water อัตราส่วน 10:2:1 ตามวิธีของ Cheung, L.M. [22] และจำแนกชนิดของ phenolic compound ตามจำนวนของ hydroxyl group โดย spray ด้วย 2% (w/v) FeCl_3 ใน ethanol เนื่องจากในการสกัดได้ทำการสกัดพิกุลผลอ่อนก่อนผลระยะอื่นๆจึงเลือกใช้พิกุลผลอ่อน fraction 1 2 และ 3 เป็นตัวอย่างในการศึกษา

วิธีการทดลอง

1. ตัด silica gel-TLC plate ให้มีขนาดกว้าง 5 ซม. สูง 9 ซม.
2. spot สารละลายมาตรฐาน catechin catechol gallic acid และ quercetin จาก stock เข้มข้น 0.01 M และสารสกัดจากพิกุลผลอ่อน fraction 1 2 และ 3 ที่ไว้ให้แห้งแล้ว spot ซ้ำอีกสองครั้งทิ้งไว้จนแห้งตัดขอบทั้งสองข้างออกเล็กน้อย
3. นำ TLC plate ไปตั้งใน mobile phase tank โดยให้ด้านที่ spot อยู่ด้านล่างของขวดระวังอย่าให้ mobile phase ถึงสารที่ spot ไว้ปล่อยให้ mobile phase เคลื่อนที่เป็นระยะทางประมาณ 7 ซม. จึงนำออกมา ทิ้งไว้ให้แห้ง
4. spray ด้วย 2% FeCl_3 ใน ethanol แล้วนำไปอบที่ 105°C เป็นเวลา 5 นาที

ผลการทดลอง

Chromatogram ที่ได้แสดงดังรูป 3.2 และค่า R_f แสดงดังตารางที่ 3.2

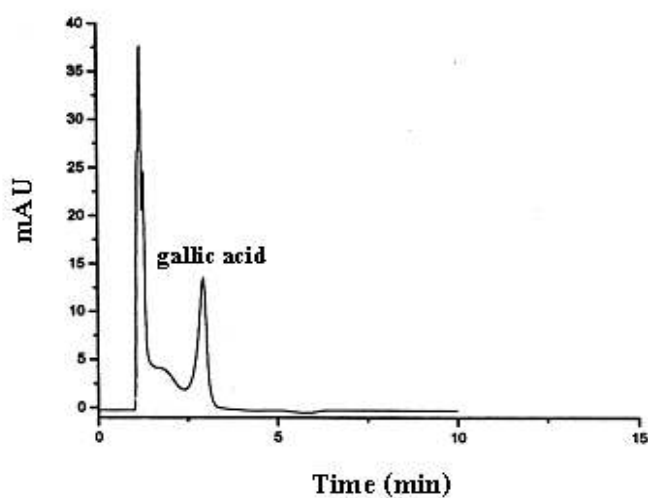


รูปที่ 3.2 Chromatogram ของสารสกัดจากพิกุลผลอ่อน (1) F1 (2) F2 (3) F3 (4) catechin (5) catechol (6) gallic acid และ (7) quercetin

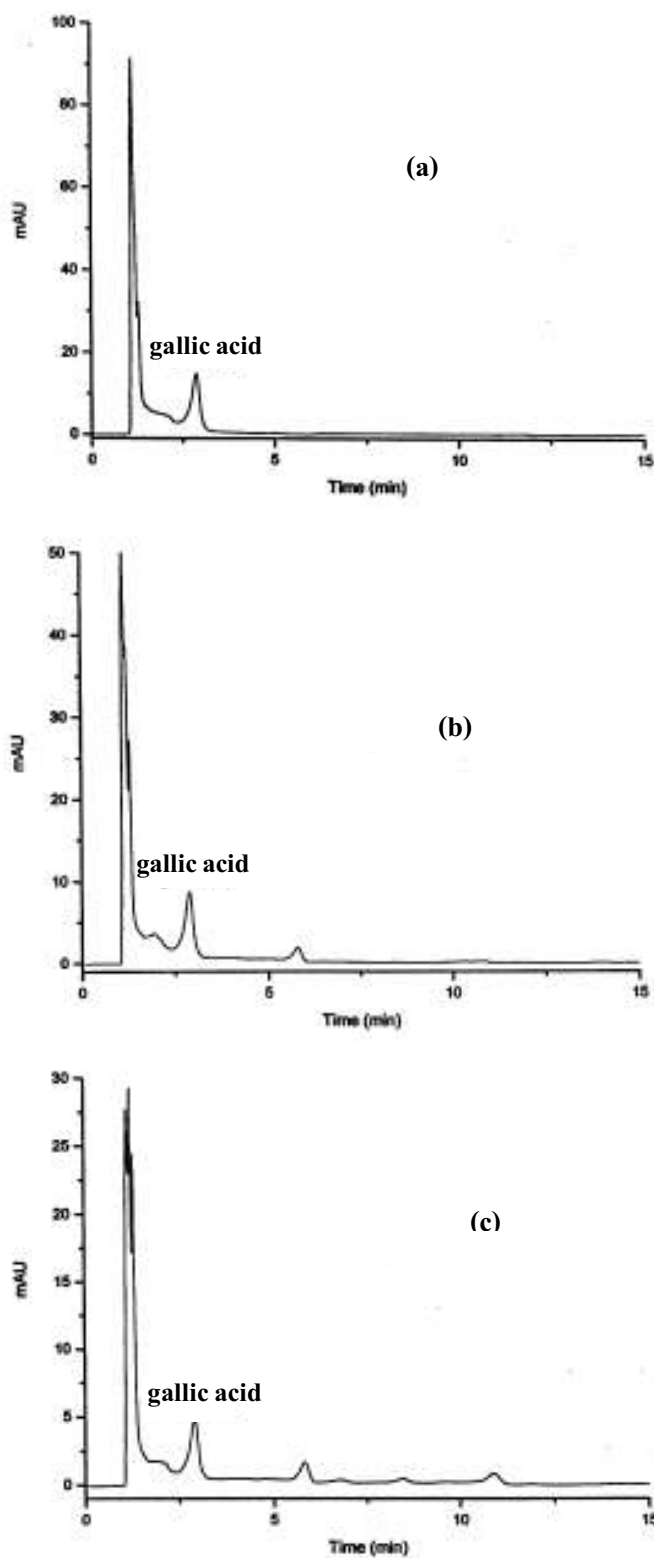
ตารางที่ 3.2 ค่า R_f ของสารละลายมาตรฐาน catechin catechol gallic acid quercetin และสารสกัดจากพิกุลพลอ่อน fraction 2 และ 3

สารละลายมาตรฐาน / สารสกัด	R_f	สีที่ปรากฏ
catechin	0.86	เขียวอ่อน
catechol	0.93	เขียวเข้ม
gallic acid	0.75	น้ำเงิน
quercetin	0.94	ดำ
F 1	0.76	น้ำเงิน
F 2	0.76, 0.83, 0.87	น้ำเงิน เขียว ดำ
F 3	0.75, 0.83, 0.87	น้ำเงิน เขียว ดำ

การหาปริมาณ antioxidant ในสารสกัดจากพิกุลด้วยเทคนิค HPLC ใช้ stationary phase เป็น Zorbax Eclipse XDB-C18 (15 cm x 3.0 mm ID, 5 μ m) mobile phase เป็น 10:90 v/v (0.1% H_3PO_4) และ UV detection ที่ 270 nm โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน gallic acid แสดงดังรูปที่ 3.3 และสารสกัดใน fraction ต่างๆ แสดงดังรูปที่ 3.4

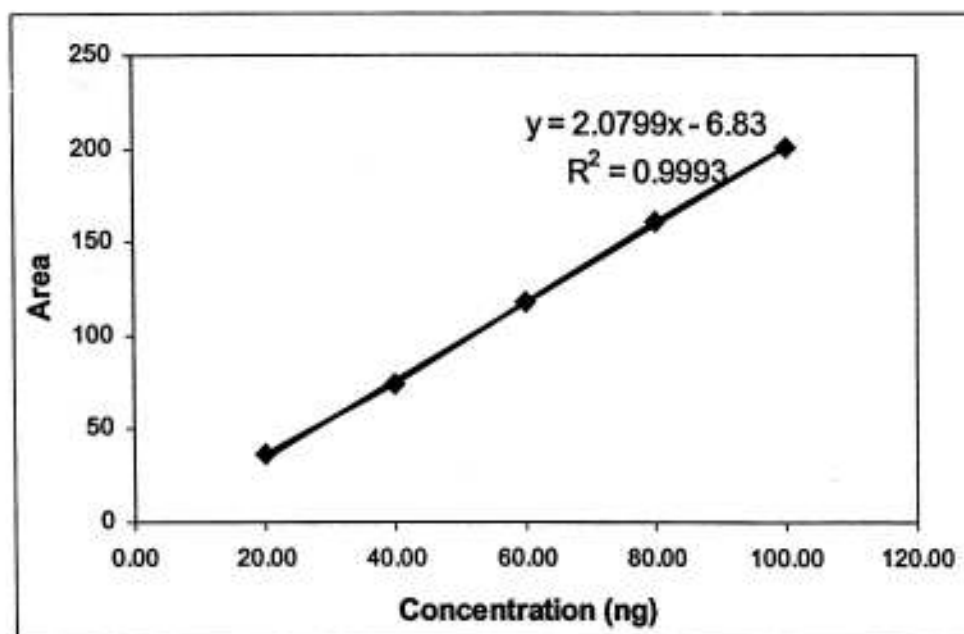


รูปที่ 3.3 โครมาโทแกรมของการแยกในสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 3 ppm



รูปที่ 3.4 โครมาโทแกรมของการแยกใน (a) F1 (40 dilution), (b) F2 (1,000 dilution) และ F3 (100 dilution) แสดงตำแหน่งที่เป็น gallic acid

Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 1-5 ng/ μ L แสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

พบว่า calibration curve ได้สมการเส้นตรงเป็น $y = 2.0799x - 6.83$ ($R^2 = 0.9993$) เมื่อนำไปใช้หาปริมาณ antioxidant ในสารสกัดจากผลพิกุลอ่อนโดยรายงานเป็นปริมาณเทียบค่า gallic acid (μ g/g of fraction) ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ปริมาณ gallic acid ในสารสกัดจากผลพิกุลอ่อน ($n = 3$)

Sample	Amount (μ g/g) $\pm$ SD
F 1	0.04 $\pm$ 0.07
F 2	6.78 $\pm$ 0.77
F 3	0.04 $\pm$ 0.02

3.3 การวิเคราะห์ antioxidant ในสารสกัดจากผลพิกุลโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV)

การศึกษา antioxidant ในสารสกัดจากผลพิกุลจะศึกษาโดยใช้เทคนิค CV ใช้เครื่อง Autolab PGSTAT 20 พร้อมโปรแกรม GPES for window version 4.5 ใช้ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้วดังนี้ working electrode เป็น Glassy carbon electrode (GCE) reference electrode เป็น Ag/AgCl (saturated KCl) และ counter electrode เป็น platinum disk electrode

3.3.1 Pretreatment ขั้ว working electrode (GCE)

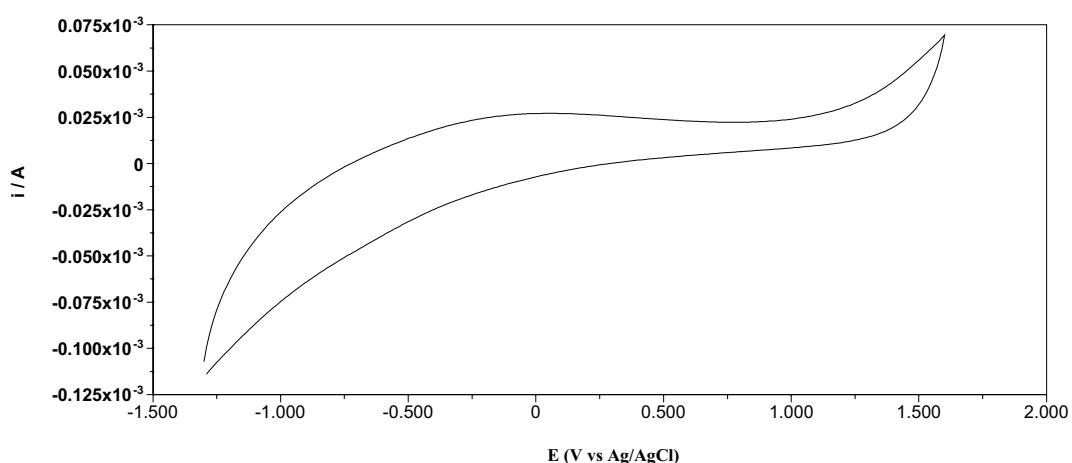
วิธีการทดลอง

1. จัดขั้ว GCE บนผ้าขัดเปียกที่มี alumina แล้ว rinse ด้วย deionized water ก่อนจัดบนผ้าขัดเปียก และ rinse ด้วย deionized water อีกครั้ง
2. ปิเปตสารละลาย 0.1 M NaHCO_3 25.00 mL ใส่ลงในเซลล์ฟันทันแก๊ส nitrogen 3 นาที เพื่อไล่ oxygen จุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในสารละลาย
3. ทำ cycling potential กำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แกขั้ว GCE ดังต่อไปนี้

Start potential (V)	:	-1.3
First vertex potential (V)	:	1.6
Second vertex potential (V)	:	-1.3
Scan rate (V/s)	:	0.05

โดยการ scan ศักย์ไฟฟ้า 3 รอบหลังจากนั้นยกขั้วทั้งสามขึ้น rinse ขั้วไฟฟ้าทั้งสามด้วย deionized water อีกครั้งจะได้ GCE ที่มีผิวขั้วพร้อมใช้งาน ลักษณะของ cyclic voltammogram ที่ได้แสดงดังรูป

3.6



รูปที่ 3.6 Cyclic voltammogram จากการทำ electrode pretreatment ขั้วใช้งานโดยใช้ 0.1 M NaHCO_3

3.3.2 การศึกษาผลของ pH ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน

antioxidant

บันทึก cyclic voltammogram ของสารมาตรฐาน catechin, ascorbic acid, catechol, caffeic acid, epigallocatechin gallate (EGCG), gallic acid และ trolox ในสารละลาย acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 7.0 และ $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 9.0 โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว GCE ตามหัวข้อ 3.2.1
2. บันทึก Cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant แต่ละชนิดโดยเปิดสารละลายมาตรฐานลงในเซลล์เคมีไฟฟ้าเพื่อหาความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 และ 0.4 mM ในสารละลาย acetate buffer pH 4.5 ที่เป็น supporting electrolyte โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองดังนี้

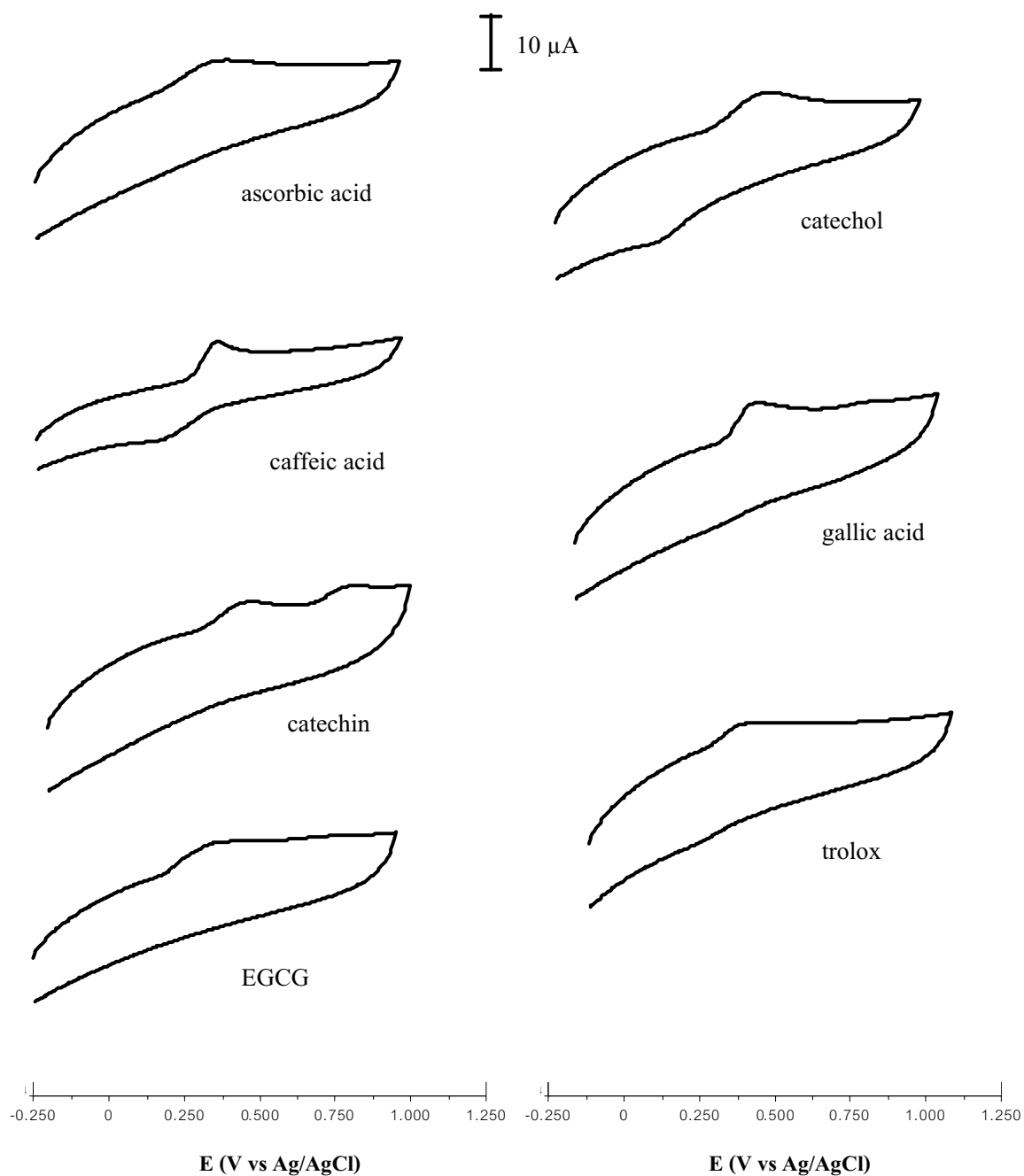
Start potential (V)	:	-0.2
First vertex potential (V)	:	1.0
Second vertex potential (V)	:	-0.2
Scan rate (V/s)	:	0.1

3. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 1 – 2 แต่เปลี่ยนสารละลาย supporting electrolyte เป็น

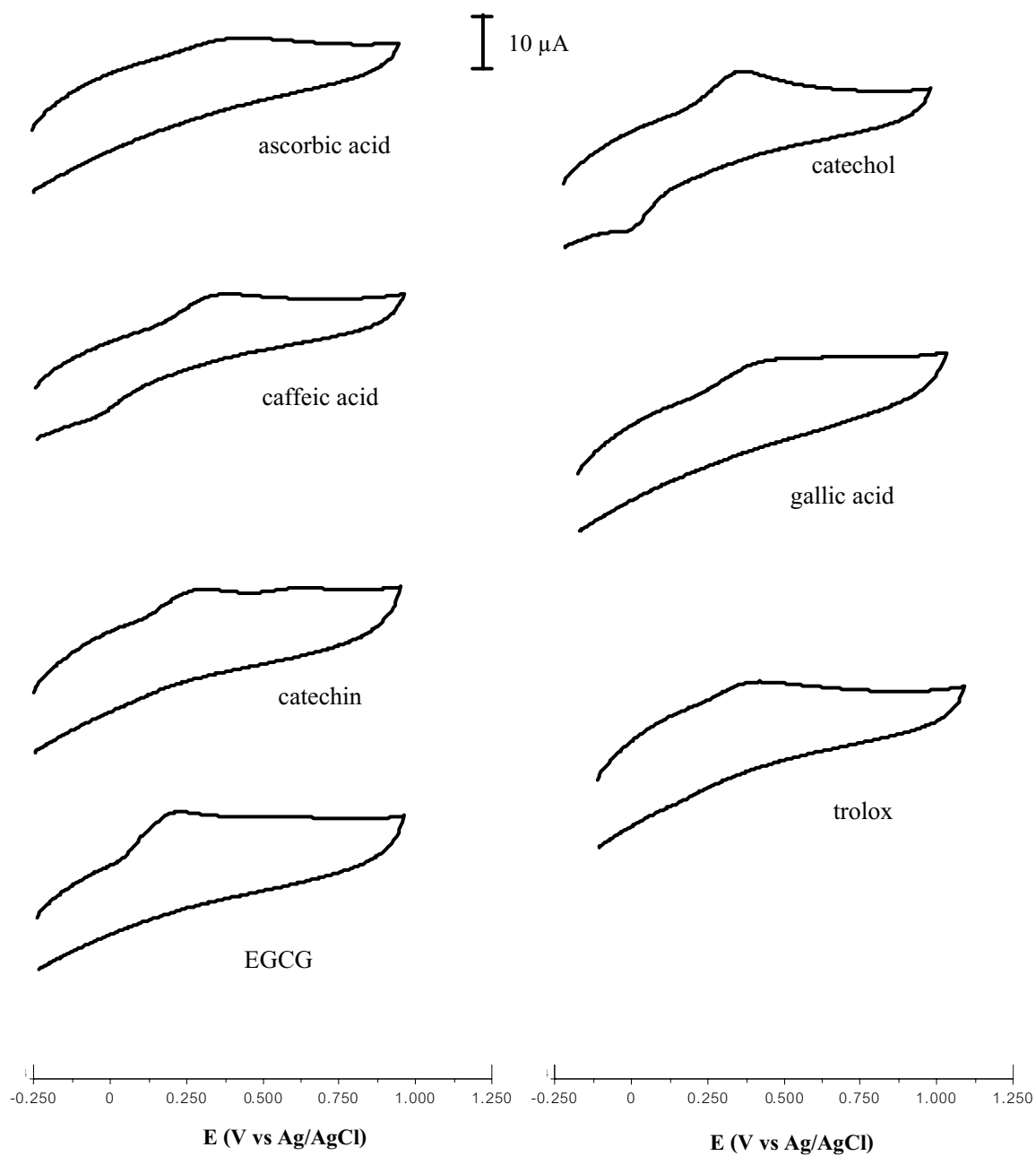
สารละลาย phosphate buffer pH 7.0 และ $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 9.0

4. ใช้โปรแกรม analysis peak search รายงานค่า E_p และ i_p ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.7 – 3.9 และตารางที่ 3.4 – 3.6

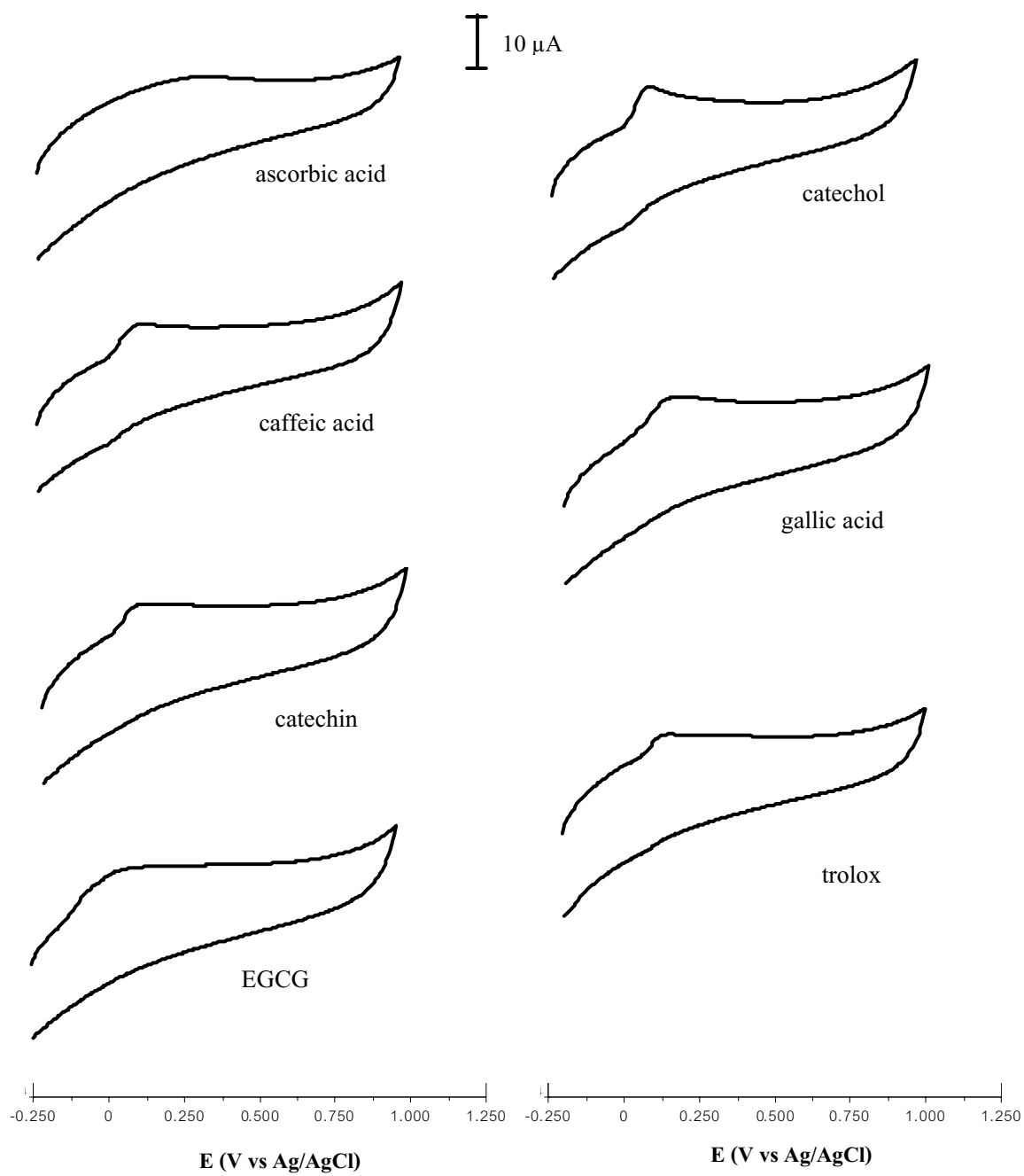
ผลการทดลอง



รูปที่ 3.7 Cyclic voltammograms ของสารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น — 0.2 mM และ
 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5



รูปที่ 3.7 Cyclic voltammograms ของสารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น — 0.2 mM และ 0.4 mM ใน phosphate buffer pH 7.0



รูปที่ 3.7 Cyclic voltammograms ของสารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น — 0.2 mM และ
 0.4 mM ใน $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer pH 4.5

ตารางที่ 3.4 ค่า E_{pa} , E_{pc} , i_{pa} และ i_{pc} ของสารละลายมาตรฐานใน acetates buffer pH 4.5

Antioxidant	Concentration (mM)	E_p (V vs Ag/AgCl)		i_p (μ A)	
		E_{pa}	E_{pc}	i_{pa}	i_{pc}
catechin	0.20 mM	0.444	-	2.537	-
		0.792	-	2.233	-
	0.40 mM	0.490	-	3.655	-
		0.802	-	1.855	-
EGCG	0.20 mM	0.394	-	2.924	-
	0.40 mM	0.394	-	4.169	-
gallic acid	0.20 mM	0.389	-	4.453	-
	0.40 mM	0.394	-	9.061	-
ascorbic acid	0.20 mM	0.389	-	2.887	-
	0.40 mM	0.470	-	4.971	-
trolox	0.20 mM	0.303	0.168	2.481	0.2704
	0.40 mM	0.309	0.157	4.824	0.7050
caffeic acid	0.20 mM	0.394	0.223	4.648	1.994
	0.40 mM	0.424	0.163	9.417	3.653
catechol	0.20 mM	0.490	0.147	4.473	1.782
	0.40mM	0.470	0.157	9.769	5.617
Capacity sequence		trolox > EGCG $\approx$ gallic acid > caffeic acid > ascorbic acid $\approx$ catechol > catechin			

E_{pa} = anodic peak potential

E_{pc} = cathodic peak potential

i_{pa} = anodic peak current

i_{pc} = cathodic peak current

ตารางที่ 3.5 ค่า E_{pa} , E_{pc} , i_{pa} และ i_{pc} ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant ใน phosphate buffer pH 7.0

Antioxidant	Concentration (mM)	E_p (V vs Ag/AgCl)		i_p (μ A)	
		E_{pa}	E_{pc}	i_{pa}	i_{pc}
catechin	0.20 mM	0.319	-	2.490	-
		0.671	-	5.150	-
	0.40 mM	0.324	-	4.527	-
		0.676	-	0.949	-
EGCG	0.20 mM	0.243	-	4.585	-
	0.40 mM	0.258	-	8.363	-
gallic acid	0.20 mM	0.409	-	3.239	-
	0.40 mM	0.414	-	5.853	-
ascorbic acid	0.20 mM	0.450	-	2.165	-
	0.40 mM	0.434	-	3.424	-
trolox	0.20 mM	0.309	-	2.318	-
	0.40 mM	0.268	-	3.996	-
caffeic acid	0.20 mM	0.384	0.001	3.026	1.038
	0.40 mM	0.399	0.019	5.565	2.041
catechol	0.20 mM	0.374	0.022	4.573	2.597
	0.40mM	0.359	0.032	9.171	5.577
Capacity sequence		EGCG > trolox > catechin > catechol > caffeic acid > gallic acid > ascorbic acid			

E_{pa} = anodic peak potential

E_{pc} = cathodic peak potential

i_{pa} = anodic peak current

i_{pc} = cathodic peak current

ตารางที่ 3.6 ค่า E_{pa} , E_{pc} , i_{pa} และ i_{pc} ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant ใน NH_3/NH_4Cl pH 9.0

Antioxidant	Concentration (mM)	E_p (V vs Ag/AgCl)		i_p (μA)	
		E_{pa}	E_{pc}	i_{pa}	i_{pc}
catechin	0.20 mM	0.112	-	4.023	-
	0.40 mM	0.112	-	8.853	-
EGCG	0.20 mM	0.072	-	5.259	-
	0.40 mM	0.097	-	6.631	-
gallic acid	0.20 mM	0.147	-	7.264	-
	0.40 mM	0.173	-	9.233	-
ascorbic acid	0.20 mM	-	-	-	-
	0.40 mM	-	-	-	-
trolox	0.20 mM	0.132	-	2.993	-
	0.40 mM	0.142	-	4.951	-
caffeic acid	0.20 mM	0.132	-	5.072	-
	0.40 mM	0.198	-	7.342	-
catechol	0.20 mM	0.177	-	6.864	-
	0.40mM	0.112	-	8.607	-
Capacity sequence		EGCG > catechin $\approx$ catechol > trolox > gallic acid > caffeic acid			

E_{pa} = anodic peak potential

E_{pc} = cathodic peak potential

i_{pa} = anodic peak current

i_{pc} = cathodic peak current

การวิเคราะห์ antioxidant activity ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant โดยเทคนิค cyclic voltammetry อาศัยการเปรียบเทียบค่า E_{pa} ของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดโดยที่ตำแหน่งค่า E_{pa} ของสารใดมีค่าน้อยหมายถึงสามารถเกิดออกซิเดชันได้ง่ายจึงเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี ซึ่งจากค่า E_{pa} ของสารที่ศึกษาเรียงลำดับดังนี้

ในสารละลาย acetate buffer pH 4.5 เรียงลำดับตำแหน่ง E_{pa} เป็น catechin > ascorbic acid $\approx$ catechol > caffeic acid > EGCG $\approx$ gallic acid > trolox จึงเรียงลำดับ antioxidant capacity ได้เป็น trolox > EGCG $\approx$ gallic acid > caffeic acid > ascorbic acid $\approx$ catechol > catechin

ในทำนองเดียวกันในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 เรียงลำดับตำแหน่ง E_{pa} ได้เป็น ascorbic acid > gallic acid > caffeic acid > catechol > catechin > trolox > EGCG จึงให้ลำดับ antioxidant activity เป็น EGCG > trolox > catechin > catechol > caffeic acid > gallic acid > ascorbic acid

ส่วนในสารละลาย $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer pH 9.0 เรียงลำดับตำแหน่ง E_{pa} ได้เป็น caffeic acid > gallic acid > trolox > catechin $\approx$ catechol > EGCG ซึ่งจัดลำดับ antioxidant activity พบว่า EGCG > catechin $\approx$ catechol > trolox > gallic acid > caffeic acid ส่วน ascorbic acid นั้นจะไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ pH 9.0

pH ของ supporting electrolyte มีผลต่อปฏิกิริยาที่ขั้วของสาร antioxidant จึงทำให้เรียงลำดับ antioxidant activity ได้ต่างกัน

3.3.3 การศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolytes ต่อ cyclic voltammogram

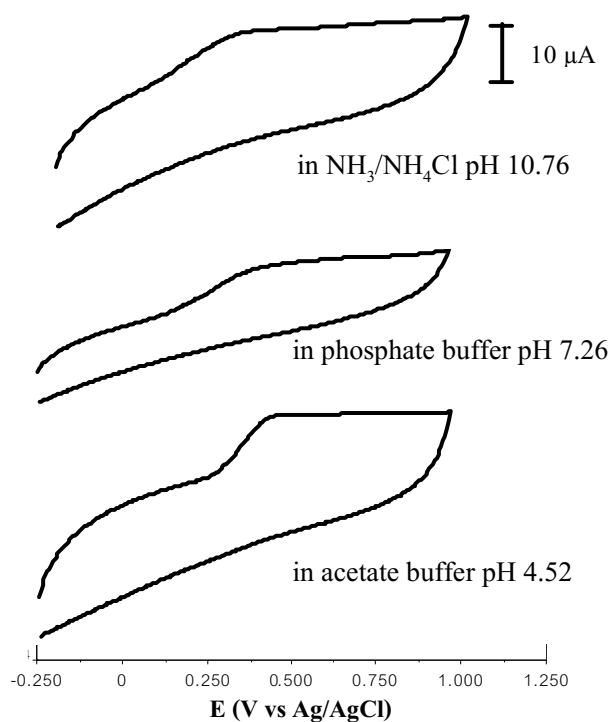
ของสารสกัดจากผลพิทูล

ในการศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolyte ต่อ cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิทูลโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry โดยใช้ตัวอย่างเป็นสารสกัดจากผลพิทูลแก่จัด fraction2 เข้มข้น 1,308 ppm ซึ่งน่าจะเป็นระยะ และ fraction ที่มีปริมาณ antioxidant มากที่สุด เมื่อใช้สารละลาย supporting electrolytes buffer pH ต่างๆคือ acetate buffer pH 4.52 phosphate buffer pH 7.26 และ $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ buffer pH 10.76

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. บันทึก cyclic voltammogram ของสารสกัดข้างต้นโดยใช้สภาวะของการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.2
3. ใช้ analysis peak search รายงานค่า E_p และ i_p ผลการทดลองแสดงในรูป 3.10 และตารางที่ 3.7
4. พล็อต E_{pa} กับ pH ของสารละลาย supporting electrolyte และ i_{pa} กับ pH ของสารละลาย supporting electrolyte แสดงดังรูป 3.11 และ 3.12

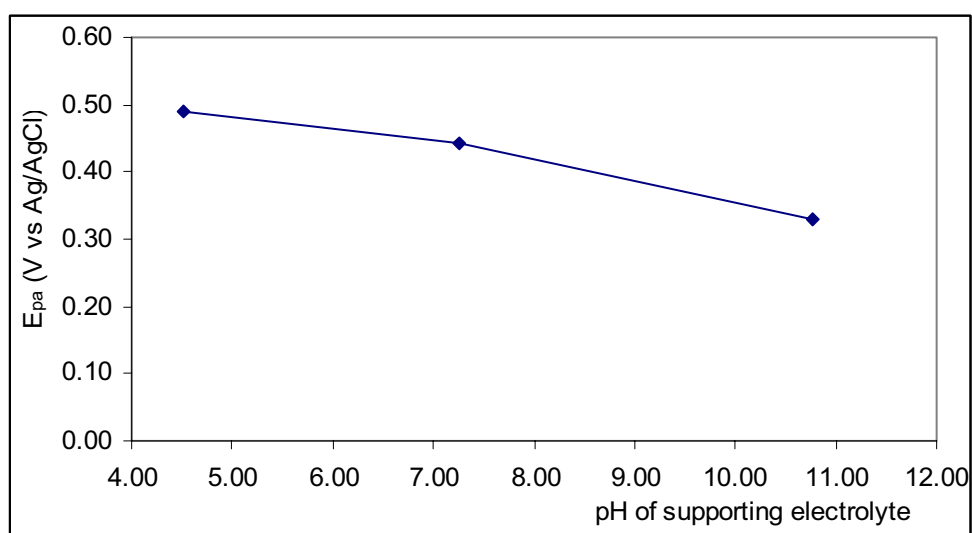
ผลการทดลอง



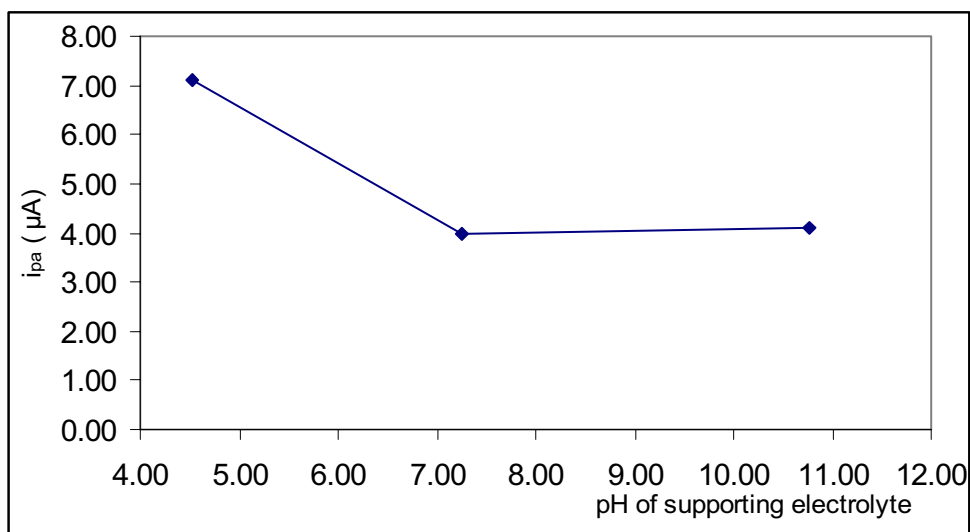
รูปที่ 3.10 Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิทูลแก่จัด F2 เข้มข้น 1,308 ppm ในสารละลาย buffer pH ต่างๆ

ตารางที่ 3.7 ค่า E_{pa} และ i_{pa} ของสารสกัดจากผลพริกแกง fraction 2 เข้มข้น 1,308 ppm ในสารละลาย buffer pH ต่างๆ

Supporting electrolyte	E_{pa} (V)	i_{pa} (μ A)
Acetate buffer pH 4.52	0.490	7.093
Phosphate buffer pH 7.26	0.444	3.962
NH_3/NH_4Cl buffer pH 10.76	0.329	4.084



รูปที่ 3.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง E_{pa} กับ pH เพื่อศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolyte ต่อ E_{pa} ของสารสกัดจากพริกผลแก่ F2 เข้มข้น 1,308 ppm



รูปที่ 3.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง i_{pa} กับ pH เพื่อศึกษาผลของชนิด pH ของ supporting electrolyte ต่อ E_{pa} ของสารสกัดจากพิกุลผลแก่ F2 เข้มข้น 1,308 ppm

จากกราฟที่ 3.11 แสดงการพลอตระหว่าง E_{pa} กับ pH พบว่าเมื่อ pH ของสารละลาย electrolyte สูงขึ้นค่า E_{pa} จะลดลงนั่นหมายความว่าเกิดการเกิดปฏิกิริยา oxidation ที่ขั้วของสารสกัด fraction 2 จะเกิดได้ง่ายขึ้นและ deprotonation ง่ายขึ้น

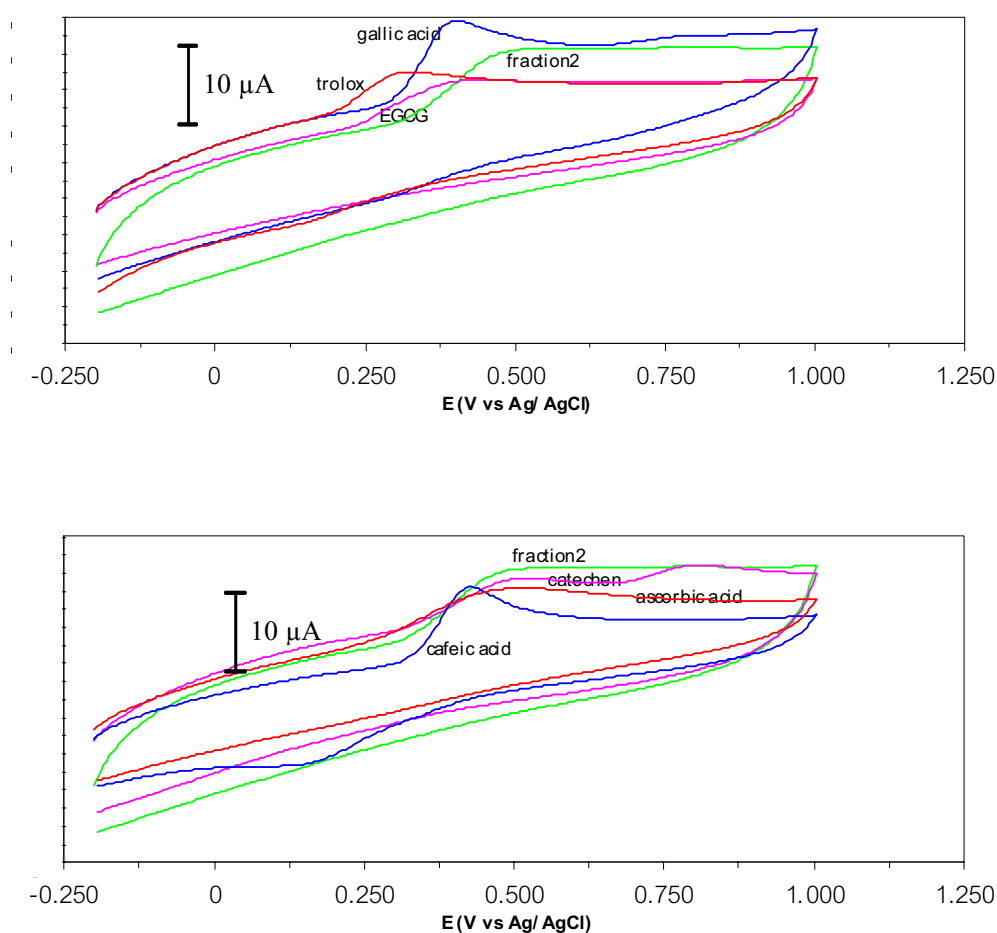
จากกราฟที่ 3.12 แสดงการพลอตระหว่าง i_{pa} กับ pH พบว่าที่ pH 4.50 ของสารละลาย acetate buffer เป็น pH ที่ให้กระแส anodic สูงที่สุดดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย acetate buffer นี้เป็นสารละลาย supporting electrolyte สำหรับการศึกษาสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดจากผลพิกุลในเทคนิค voltammetry ต่อไป

3.3.4 การเลือกสารมาตรฐาน antioxidant สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งาน โดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. บันทึก cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction 2 เข้มข้น 1,308 ppm ใน acetate buffer pH 4.5 ปริมาตร 25 ml โดยใช้สภาวะของการทดลองเช่นเดียวกันกับ ข้อ 3.3.2
3. เปรียบเทียบ cyclic voltammogram ของตัวอย่างกับสารมาตรฐานแสดงในรูปที่ 3.13 ค่า E_{pa} และ i_{pa} เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แสดงในตารางที่ 3.8

ผลการทดลอง



รูปที่ 3.13 Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด F2 เข้มข้น 1,308 ppm, gallic acid, trolox, epigallocatechin gallate (EGCG), ascorbic acid, caffeic acid และ catechin เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5

ตารางที่ 3.8 ค่า E_{pa} และ i_{pa} ของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction2 เข้มข้น 1,308 ppm และสารมาตรฐาน (gallic acid, trolox, epigallocatechin gallate (EGCG), ascorbic acid, caffeic acid และ catechin) เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5

สารละลาย	E_{pa} (V vs Ag/AgCl)	i_{pa} (μ A)
gallic acid	0.394	9.061
trolox	0.309	4.824
EGCG	0.394	4.169
ascorbic acid	0.470	4.971
caffeic acid	0.424	9.417
catechin	0.490	3.655
	0.802	1.855
F2	0.490	6.879

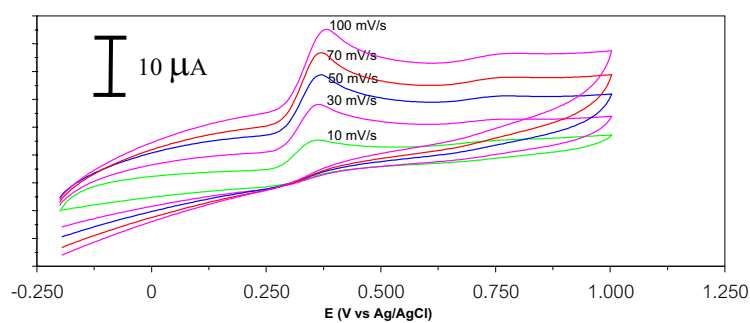
จากผลการทดลองคาดว่าในสารสกัดจากพิกุลผลแก่จัด F2 จะประกอบไปด้วยสาร antioxidant หลายตัว ในการหาปริมาณ antioxidant ในสารสกัดจากพิกุลจึงเป็นการวิเคราะห์ antioxidant activity ของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่าง ทั้งนี้จะเลือกใช้ gallic acid เป็นสาร antioxidant มาตรฐาน เนื่องจากในการศึกษาโดยใช้เทคนิค TLC ในตอนที่ 3.2 พบว่าในสารสกัดจากพิกุลทุก fraction น่าจะมี gallic acid เป็นองค์ประกอบและเมื่อเปรียบเทียบปริมาณอย่างคร่าวๆบนแผ่น TLC แล้วพบว่า มี gallic acid อยู่ปริมาณมากที่สุด โดยดูจากความเข้มของสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC และจะรายงาน antioxidant activity ในสารสกัดจากพิกุลในรูปแบบ gallic acid equivalent (GAE) และจากค่า E_{pa} ของสารมาตรฐานและสารสกัดจาก F2 ของพิกุลผลแก่จัด สามารถเรียงลำดับ antioxidant activity ได้ดังนี้ trolox > EGCG $\approx$ gallic acid > caffeic acid > ascorbic acid $\approx$ catechol > catechin $\approx$ fraction 2

3.3.5 การศึกษาผลของ scan rate ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. บันทึก cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน 0.40 mM gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้ scan rate 10, 30, 50, 70 และ 100 mV/s ลักษณะของ cyclic voltammogram แสดงดังรูป 3.14 ค่า E_{pa} และ i_{pa} แสดงดังตาราง 3.9 เมื่อพลอตกราฟระหว่าง i_{pa} กับ $v^{1/2}$ i_{pa} กับ v และ $\log(i_{pa})$ กับ $\log(\text{scanrate})$ ผลที่ได้แสดงดังรูป 3.15 - 3.17 ตามลำดับ

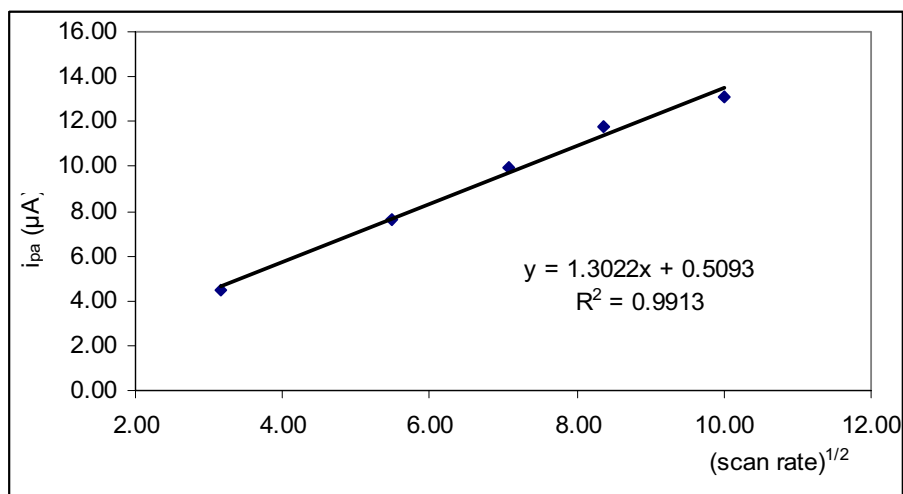
ผลการทดลอง



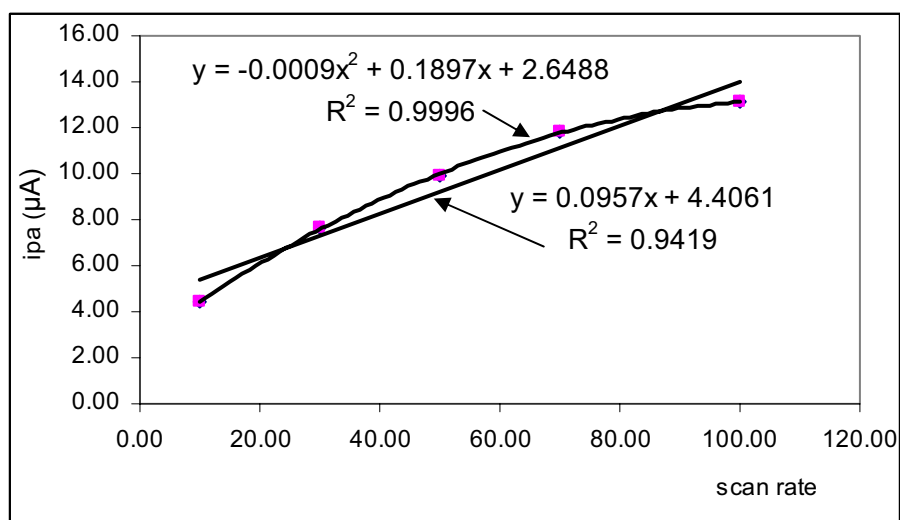
รูปที่ 3.14 Cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน 0.40 mM gallic acid ที่ scan rate ต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5

ตารางที่ 3.9 ค่า E_{pa} และ i_{pa} จาก cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน 0.40 mM gallic acid ที่ scan rate ต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5

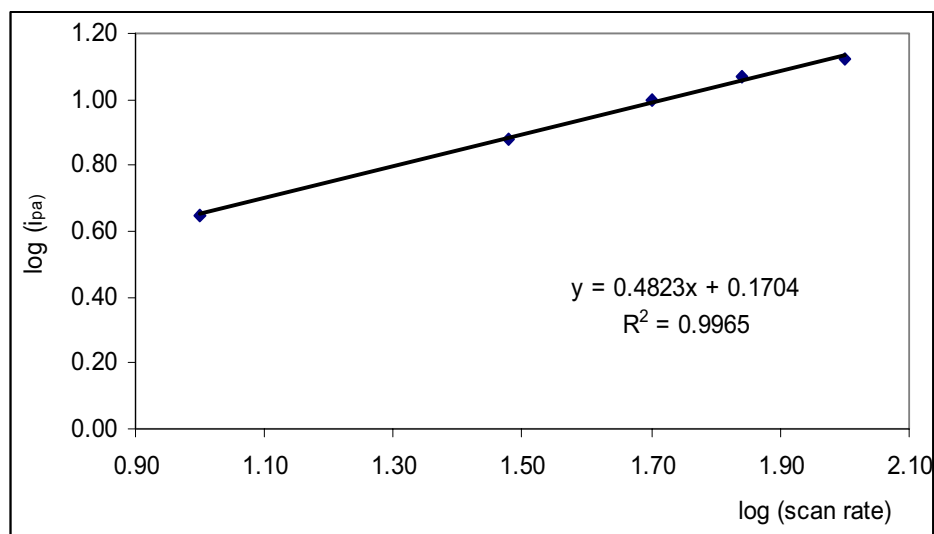
Scan rate (mV/s)	(scan rate) ^{1/2}	E_{pa} (V vs Ag/AgCl)	i_{pa} (μA)
10	3.16	0.360	4.441
30	5.48	0.630	7.648
50	7.07	0.364	9.916
70	8.37	0.369	11.81
100	10.0	0.379	13.11



รูปที่ 3.15 พล็อตระหว่าง i_{pa} กับ $v^{1/2}$ จาก cyclic voltammogram ของ gallic acid เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5



รูปที่ 3.16 พล็อตระหว่าง i_{pa} กับ v จาก cyclic voltammogram ของ gallic acid เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5



รูปที่ 3.17 พล็อตระหว่าง $\log(i_{pa})$ กับ $\log(\text{scanrate})$ จาก cyclic voltammogram ของ gallic acid เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5

จากกราฟแสดงการพล็อตระหว่าง i_{pa} กับ $(\text{scan rate})^{1/2}$ และ i_{pa} กับ scan rate พบว่ากราฟแสดงการพล็อตระหว่าง i_{pa} กับ $(\text{scan rate})^{1/2}$ เป็นเส้นตรง ในขณะที่กราฟแสดงการพล็อตระหว่าง i_{pa} กับ scan rate เป็นเส้นโค้ง และกราฟแสดงการพล็อตระหว่าง $\log(i_{pa})$ กับ $\log(\text{scan rate})$ เป็นสมการเส้นตรงและมีความชันใกล้เคียงกับ 0.4823 ซึ่งใกล้เคียงกับ 0.50 นั้นแสดงว่ากระแสที่เกิดขึ้นเป็นกระแสที่เกิดขึ้นจากการแพร่ (diffusion current) สามารถใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้

3.3.6 การทำ calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จากเทคนิค cyclic voltammetry

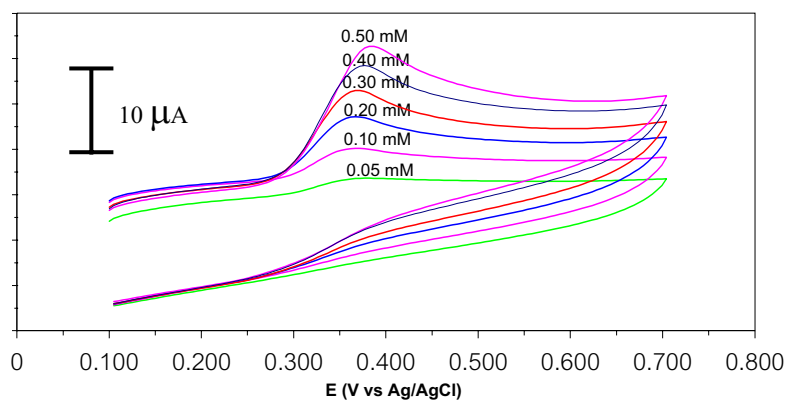
วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. บันทึก cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 mM ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองดังนี้

Start potential (V)	:	0.1
First vertex potential (V)	:	0.7
Second vertex potential (V)	:	0.1
Scan rate (V/s)	:	0.05

3. ใช้ analysis peak search รายงานค่า E_{pa} , i_{pa} และ Q ผลการทดลองแสดงในรูป 3.18 และตารางที่ 3.10
4. พล็อตความสูงของพีค (i_{pa}) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid และ พื้นที่ใต้พีค (Q) ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.30 – 0.70 V กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กราฟที่ได้แสดงดังรูป 3.19 และ 3.20 ตามลำดับ

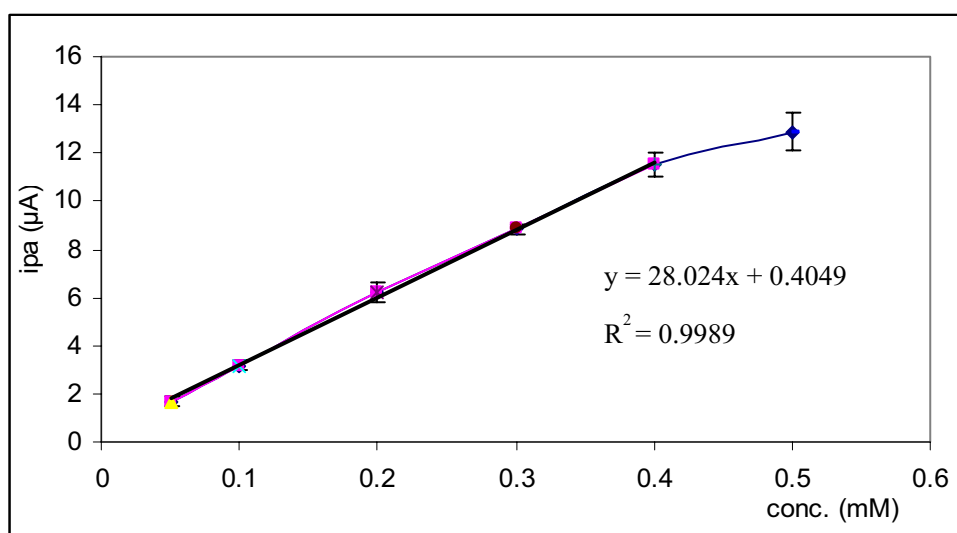
ผลการทดลอง



รูปที่ 3.18 Cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5

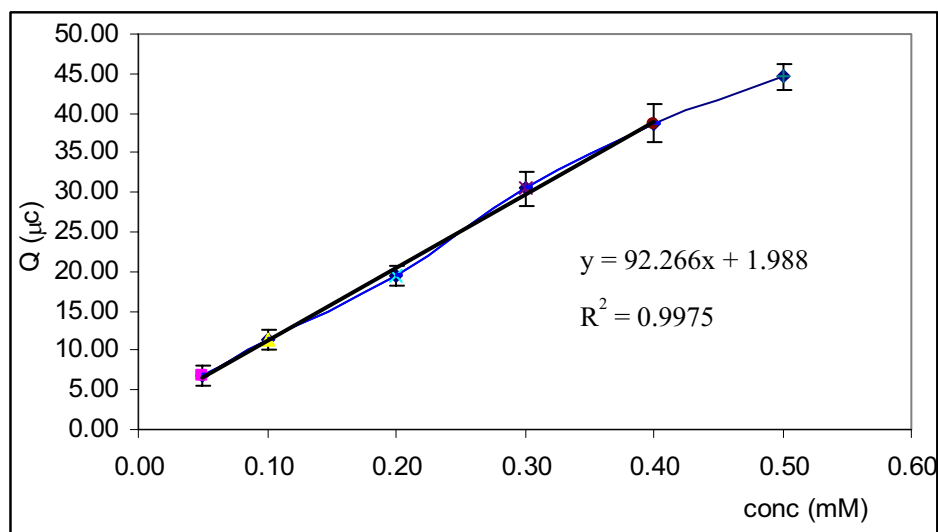
ตารางที่ 3.10 ค่า i_{pa} และ Q ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5

Conc. mM	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		เฉลี่ย $\pm$ SD	
	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)
0.05	1.621	5.866	1.521	5.845	1.929	8.690	1.69 ± 0.21	6.80 ± 1.64
0.10	2.955	9.839	3.302	11.26	3.301	13.06	3.19 ± 0.20	11.39 ± 1.61
0.20	5.807	17.60	6.294	20.31	6.577	20.39	6.23 ± 0.39	19.43 ± 1.59
0.30	8.597	27.54	8.800	31.08	9.085	32.80	8.83 ± 0.25	30.47 ± 2.68
0.40	10.93	35.70	11.75	38.97	11.85	41.51	11.51 ± 0.50	38.73 ± 2.91
0.50	12.03	42.37	13.04	46.00	13.56	45.60	12.88 ± 0.78	44.66 ± 1.99



รูปที่ 3.19 พล็อตระหว่าง i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry

จาก calibration curve ที่พล็อตระหว่าง i_{pa} ที่ศักย์ไฟฟ้า 370 mV vs Ag/AgCl กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid พบว่า calibration curve เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.40 mM มีสมการเส้นตรง $y = 28.024x + 0.405$ และมี $R^2 = 0.9989$



รูปที่ 3.20 พล็อตระหว่าง Q กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry

จาก calibration curve ที่พล็อตระหว่าง Q ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 300 – 700 mV vs Ag/AgCl กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid พบว่า calibration curve เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.40 mM ได้สมการเส้นตรง $y = 92.266x + 1.988$ และมี $R^2 = 0.9975$

จาก calibration curve ทั้งสองพบว่า calibration curve เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.40 mM ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากขั้วใช้งาน GCE มีพื้นที่ผิวจำกัดจำกัด การเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วจึงมีจำกัด ทำให้ที่ความเข้มข้นสูงๆนั้นการตอบสนองจะไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น จากการพล็อต calibration curve ทั้งสองวิธีพบว่า calibration curve ที่ได้จากการพล็อตระหว่าง Q กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จะให้ calibration sensitivity สูงกว่า calibration curve ที่ได้จากการพล็อตระหว่าง i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เนื่องจาก cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid มีลักษณะเป็นพีคที่ broad นั้นเอง เนื่องจากเทคนิค cyclic voltammetry นั้นเป็นเทคนิคที่มี sensitivity ต่ำเมื่อเทียบกับเทคนิค differential pulse voltammetry (DPV) [24] ในการวิเคราะห์ antioxidant activity ในตัวอย่างสารสกัดจากผลพิกุลจึงเลือกใช้เทคนิค DPV

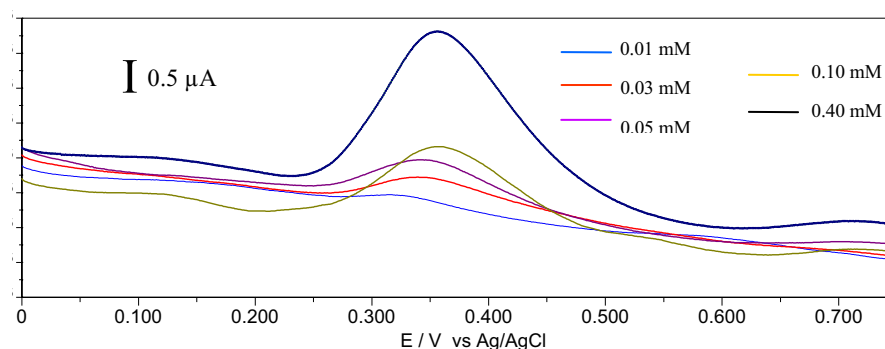
3.3.7 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งาน โดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. บันทึก differential pulse voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.40 และ 0.20 mM ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองดังนี้

Initial potential (V)	:	0
End potential (V)	:	1
Step potential (V)	:	0.001
Pulse amplitude (V)	:	0.05

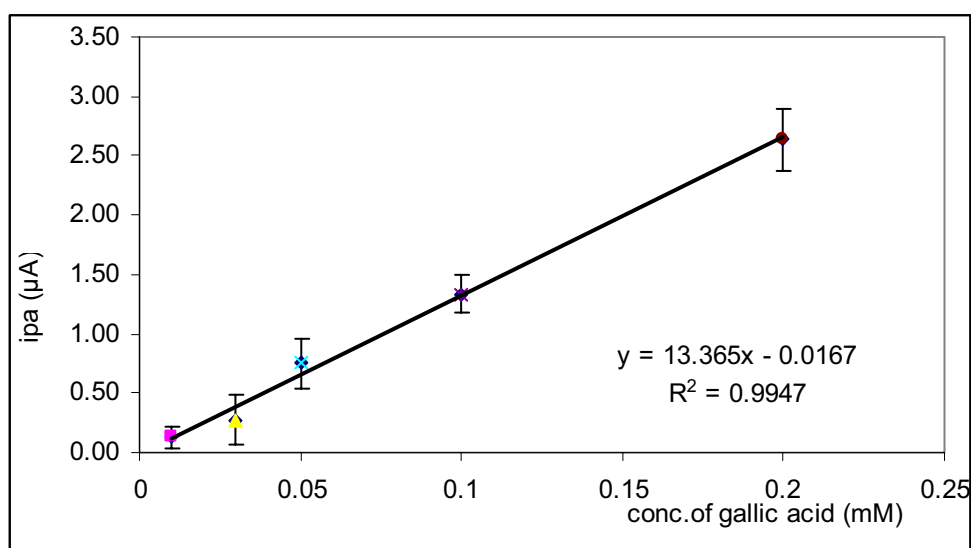
3. ใช้ analysis peak search รายงานค่า E_{pa} , i_{pa} และพื้นที่ใต้พีค (Q) ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.23 – 0.50 V ผลการทดลองแสดงในรูป 3.21 และตารางที่ 3.11
4. พล็อต i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid และ Q กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กราฟที่ได้แสดงดังรูป 3.22 และ 3.23



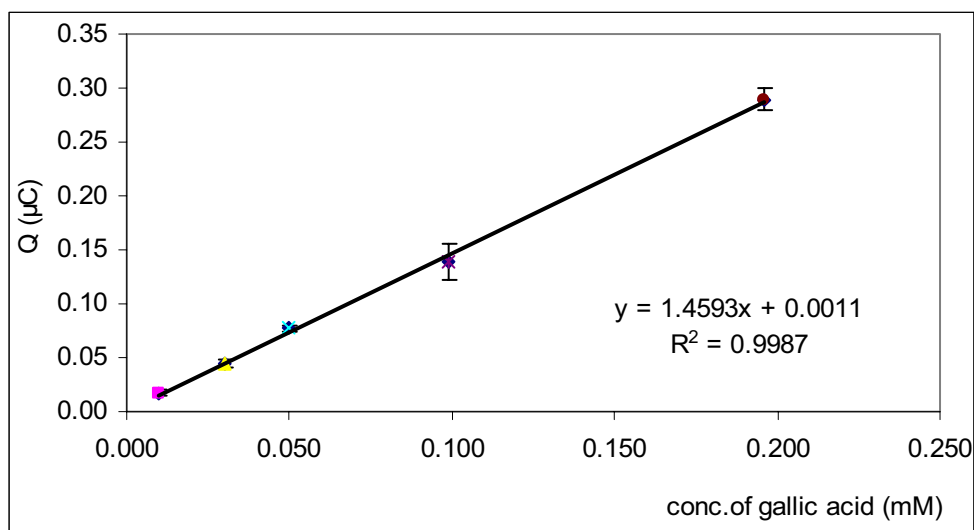
รูปที่ 3.21 Differential pulse voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆใน acetate buffer pH 4.5

ตารางที่ 3.11 ค่า i_{pa} และ พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน acetate buffer pH 4.5

Conc. mM	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		เฉลี่ย $\pm$ SD	
	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)	i_{pa} (μ A)	Q (μ C)
0.01	0.159	0.015	0.206	0.020	0.017	0.016	0.127 ± 0.098	0.017 ± 0.00
0.03	0.388	0.046	0.410	0.046	0.032	0.040	0.277 ± 0.212	0.044 ± 0.00
0.05	0.654	0.079	0.609	0.074	0.99	0.078	0.751 ± 0.208	0.077 ± 0.00
0.10	0.801	0.126	1.060	0.133	2.14	0.159	1.334 ± 0.160	0.139 ± 0.02
0.20	2.270	0.295	2.220	0.278	3.43	0.296	2.640 ± 0.260	0.290 ± 0.01



รูปที่ 3.22 พล็อตระหว่าง i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้เทคนิค DPV



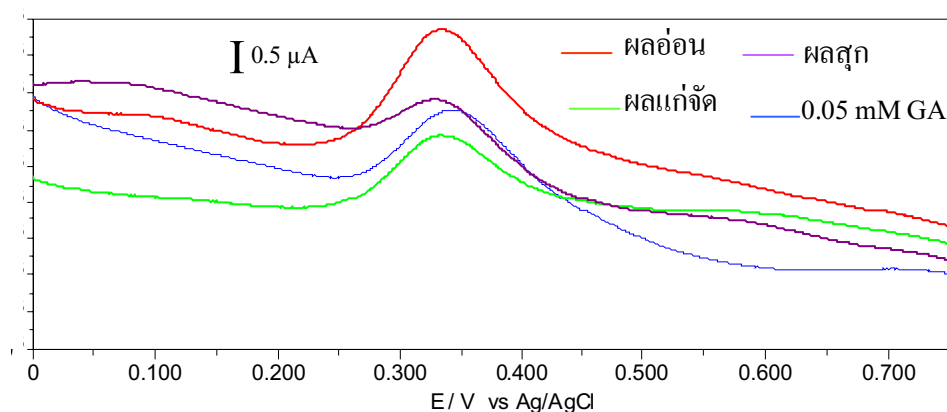
รูปที่ 3.23 พล็อตระหว่าง พื้นที่ใต้พีค (Q) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 โดยใช้เทคนิค DPV

จาก calibration curve ที่พล็อตระหว่าง i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid และพื้นที่ใต้พีค (Q) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid พบว่า calibration curve ที่พล็อตระหว่าง i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ได้สมการเส้นตรง $y = 13.36x - 0.017$ และมี $R^2 = 0.9947$ ส่วน calibration curve ที่พล็อตระหว่างพื้นที่ใต้พีค (Q) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ได้สมการเส้นตรง $y = 1.459x + 0.001$ และมี $R^2 = 0.9987$ ซึ่งสมการที่ใช้ในการวิเคราะห์ antioxidant activity ใช้สมการที่พล็อตระหว่างพื้นที่ใต้พีค (Q) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เนื่องจากในสารสกัดจากผลพิกุลมีสาร antioxidant หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ การวิเคราะห์ antioxidant activity จึงหาในรูปแบบรวมอาศัยการ fix ศักย์ไฟฟ้าในช่วงที่เท่ากันทั้งในสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

3.3.8 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ใน crude extract ของพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. บันทึก differential pulse voltammogram ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุกโดยเปิด crude extract ในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 2 mL ละลายใน acetate buffer pH 4.5 ให้มีปริมาตรรวม 25 mL ทำให้ในเซลล์มีความเข้มข้นของสารสกัดดังนี้ ผลอ่อนเข้มข้น 4706 ppm ผลแก่จัดเข้มข้น 4705 ppm และ ผลสุกเข้มข้น 4707 ppm โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.7 ซึ่งสารสกัดจากพิกุลทั้งสามระยะจะเกิด oxidation ที่ผิวขั้วให้ E_{pa} ที่ประมาณ 0.33 V vs Ag/AgCl ผลการทดลองแสดงในรูป 3.23
3. ใช้ analysis peak search รายงานค่า i_{pa} และ พื้นที่ใต้พีค (Q) โดยในช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.23 – 0.50 V ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.12
4. คำนวณ antioxidant activity ในสารสกัดจากพิกุลโดยรายงานเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg/g sample ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.13



รูปที่ 3.23 Differential pulse voltammograms ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุกใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM

ตารางที่ 3.12 ค่า i_{pa} และพื้นที่ใต้พีค (Q) ของ crude extract จากผลพิกุล

ผลพิกุล	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3	
	i_{pa} (μA)	Q (μC)	i_{pa} (μA)	Q (μC)	i_{pa} (μA)	Q (μC)
ผลอ่อน	0.8427	0.0933	0.6785	0.0688	0.8899	0.1005
ผลแก่จัด	0.5145	0.0569	0.5779	0.0584	0.6160	0.0591
ผลสุก	0.4055	0.0394	0.5122	0.0511	0.4164	0.0376

ตารางที่ 3.13 ค่า GAE ของ crude extract จากผลพิกุล (n = 3)

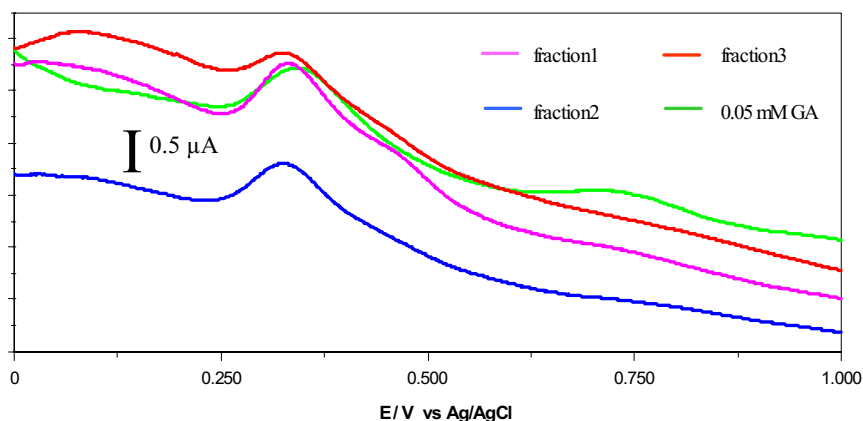
ผลพิกุล	GAE (mg/g sample)			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย $\pm$ SD
ผลอ่อน	2.46	1.81	2.65	2.31 ± 0.44
ผลแก่จัด	1.49	1.52	1.53	1.51 ± 0.02
ผลสุก	1.02	1.33	0.98	1.11 ± 0.19

จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่า GAE ของพิกุลผลอ่อนมากกว่าผลแก่จัด และผลสุก แสดงว่า antioxidant activity ในสารสกัดจากพิกุลผลอ่อนมากกว่าผลแก่จัดและผลสุกตามลำดับ

3.3.9 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ของสารสกัด fraction 1-3 ในสารสกัดจากผลพิกุลอ่อน

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. เตรียมสารสกัดจากผลพิกุล โดยเจือจางสารสกัดจากพิกุลผลอ่อนในข้อ 3.1.3 ให้มีความเข้มข้นเป็น 218, 16.9, 28.2 ppm สำหรับสารสกัด fraction1, 2 และ 3 โดยใช้ acetate buffer pH 4.5 เป็นตัวทำละลาย
3. บันทึก differential pulse voltammogram ของสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสาม fraction โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.7 ซึ่งสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสาม fraction จะเกิด oxidation ที่ผิวขั้วให้ E_{pa} ที่ประมาณ 0.33 V vs Ag/AgCl ผลการทดลองแสดงในรูป 3.24
4. ใช้ analysis peak search รายงานพื้นที่ใต้พีค (Q) ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.23 – 0.50 V ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.14
5. คำนวณ antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุลโดยรายงานเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg/g fraction ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.15



รูปที่ 3.24 Differential pulse voltammograms ของสารสกัดจากผลพิกุลผลอ่อน F1 F2 และ F3 ใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM

ตารางที่ 3.14 พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารสกัดจากผลพิกุลผลอ่อน fraction1 fraction2 และ F3 ใน acetate buffer pH 4.5

Fraction	พื้นที่ใต้พีค (Q) (μC)				
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5
F1	0.0670	0.0684	0.0751	0.0809	0.0759
F2	0.0835	0.0875	0.0670	0.0991	0.0886
F3	0.0554	0.0704	0.0575	0.0420	0.0607

ตารางที่ 3.15 ค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิกุลผลอ่อน fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5 (n = 5)

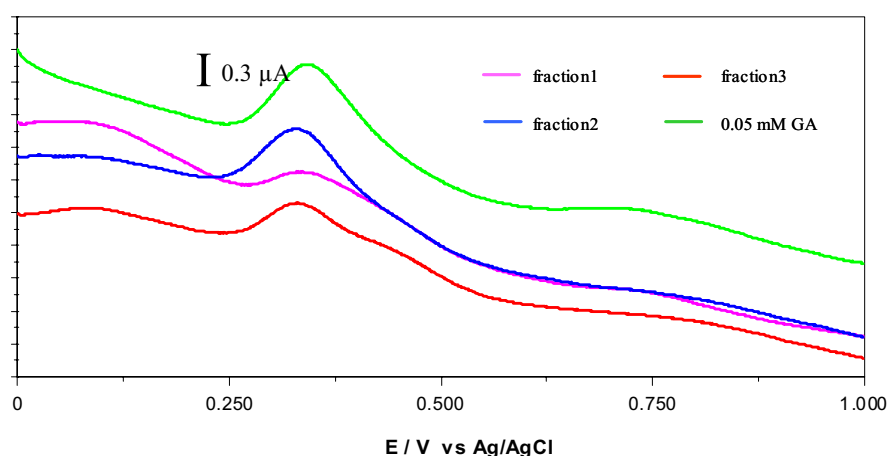
Fraction	GAE (mg/g fraction)					
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5	เฉลี่ย $\pm$ SD
F1	177.68	181.41	199.36	215.19	201.68	195.06 $\pm$ 15.46
F2	510.05	541.54	412.43	614.36	548.43	525.36 $\pm$ 73.66
F3	240.88	307.37	249.87	181.52	224.51	240.83 $\pm$ 45.53

จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ F1 ตามลำดับ ดังนั้น ปริมาณ antioxidant activity ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ F1 ตามลำดับ

3.3.10 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ของสารสกัด fraction 1-3 ในสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. เตรียมสารสกัดจากผลพิกุลโดยเจือจางสารสกัดจากพิกุลผลแก่จัดในข้อ 3.1.3 ให้มีความเข้มข้นเป็น 142, 26.2, 38.3 ppm สำหรับสารสกัด fraction1, 2 และ 3 โดยใช้ acetate buffer pH 4.5 เป็นตัวทำละลาย
3. บันทึก differential pulse voltammogram ของสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสาม fraction โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.7 ซึ่งสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสาม fraction จะเกิด oxidation ที่ผิวขั้วให้ E_{pa} ที่ประมาณ 0.33 V vs Ag/AgCl ผลการทดลองแสดงในรูป 3.25
4. ใช้ analysis peak search รายงานพื้นที่ใต้พีค (Q) ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.23 – 0.50 V ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.16
5. คำนวณ antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุลโดยรายงานเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg/g fraction ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.17



รูปที่ 3.25 Differential pulse voltammograms ของสารสกัดจากผลพิกุลผลแก่จัด F1 F2 และ F3 ใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM

ตารางที่ 3.16 พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารสกัดจากผลพิกุลผลแก่จัด fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5

Fraction	พื้นที่ใต้พีค (Q) (μC)				
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5
F1	0.0264	0.0218	0.0288	0.0358	0.0312
F2	0.0581	0.0595	0.0721	0.0646	0.0491
F3	0.0310	0.0232	0.0204	0.0304	0.0240

ตารางที่ 3.17 ค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิกุลผลแก่จัด fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5 (n = 5)

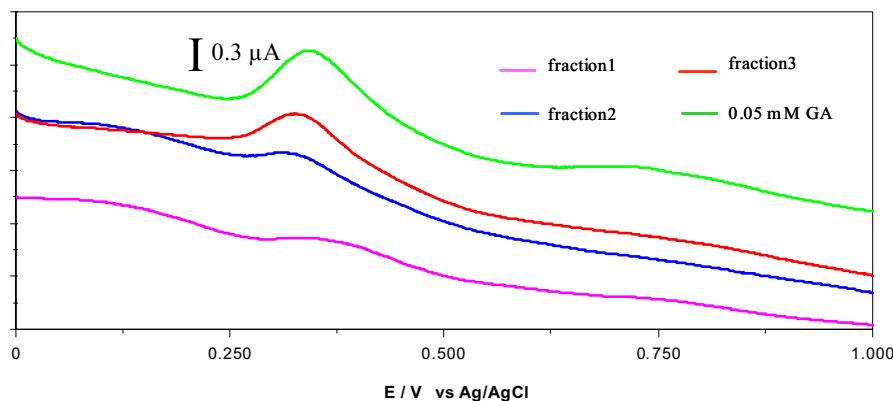
Fraction	GAE (mg/g fraction)					
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5	เฉลี่ย $\pm$ SD
F1	19.09	15.66	20.91	26.13	22.70	20.90 ± 3.92
F2	247.88	254.22	308.97	276.43	208.77	259.25 ± 36.98
F3	106.70	79.00	68.82	104.71	81.66	88.18 ± 16.72

จากผลในตารางที่ 3.17 พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ F1 ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณ antioxidant activity ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ fraction1 ตามลำดับ

3.3.11 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ของสารสกัด fraction 1-3 ในสารสกัดจากผลพิกุลสุก

วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว working electrode ตามหัวข้อ 3.3.1
2. เตรียมสารสกัดจากผลพิกุล โดยเจือจางสารสกัดจากพิกุลผลแก่จัดในข้อ 3.1.3 ให้มีความเข้มข้นเป็น 11.7, 15.5, 42.8 ppm สำหรับสารสกัด fraction1, 2 และ 3 โดยใช้ acetate buffer pH 4.5 เป็นตัวทำละลาย
3. บันทึก differential pulse voltammogram ของสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสาม fraction โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.7 ซึ่งสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสาม fraction จะเกิด oxidation ที่ผิวขั้วให้ E_{pa} ที่ประมาณ 0.33 V vs Ag/AgCl ผลการทดลองแสดงในรูป 3.26
4. ใช้ analysis peak search รายงานพื้นที่ใต้พีค (Q) ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.23 – 0.50 V ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.18
5. คำนวณ antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุลโดยรายงานเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg/g fraction ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 3.19



รูปที่ 3.26 Differential pulse voltammograms ของสารสกัดจากผลพิกุลผลสุก F1 F2 และ F3 ใน acetate buffer pH 4.5 เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05 mM

ตารางที่ 3.18 พื้นที่ใต้พีค (Q) ของสารสกัดจากผลพิกุลผลสุก fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5

Fraction	พื้นที่ใต้พีค (Q) (μC)				
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5
F1	0.0127	0.0135	0.0128	0.0172	0.0125
F2	0.0178	0.0205	0.0198	0.0264	0.0236
F3	0.0372	0.0391	0.0441	0.0508	0.0494

ตารางที่ 3.19 ค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิกุลผลสุก fraction1 fraction2 และ fraction3 ใน acetate buffer pH 4.5 (n = 5)

Fraction	GAE (mg/g fraction)					
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4	ครั้งที่5	เฉลี่ย $\pm$ SD
F1	124.68	133.77	126.07	177.48	123.07	137.01 $\pm$ 22.99
F2	136.40	158.19	152.52	205.50	183.38	167.20 $\pm$ 27.27
F3	105.95	111.57	126.07	145.87	141.80	126.25 $\pm$ 17.71

จากผลในตารางที่ 3.19 พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจากพิกุลและใช้ t-test พบว่า fraction1 $\approx$ fraction2 $\approx$ fraction3 (t-test ที่ P = 0.05) แสดงว่าปริมาณ antioxidant activity ของสารสกัดจากพิกุลทั้งสาม fraction ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.4 การศึกษา antioxidant activity โดยวิธี spectrometry

3.4.1 Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical capacity assay (DPPH assay)

3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 20 ppm

ชั่ง DPPH 0.0020 g ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ในขวด ปริมาตร

2. สารละลายมาตรฐาน gallic acid, ascorbic acid, trolox, catechin, catechol, caffeic และ epigallocatechin gallate (EGCG) ความเข้มข้นอย่างละ 100 ppm

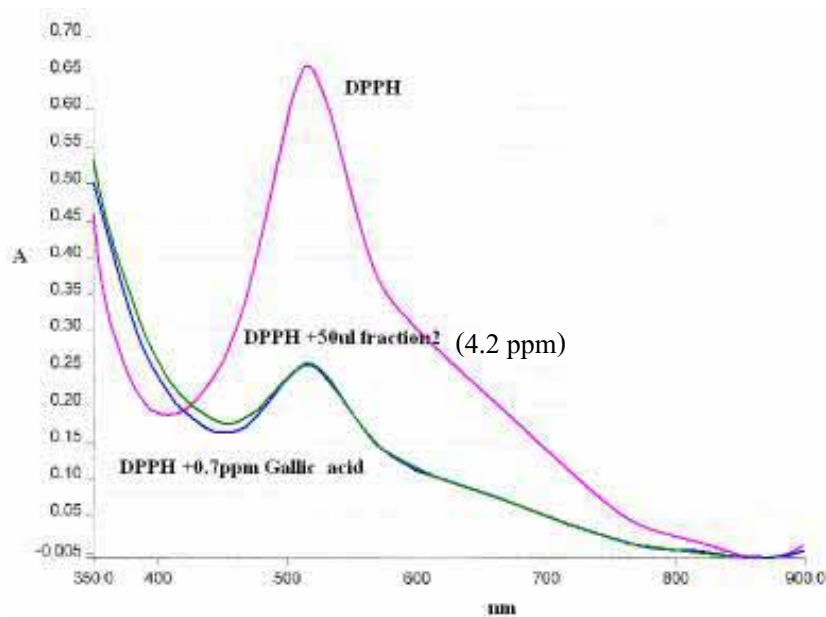
ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด 0.01 g ละลายใน methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ในขวด ปริมาตร

3.4.1.2 การศึกษา spectrum และ kinetic behaviors โดย DPPH assays

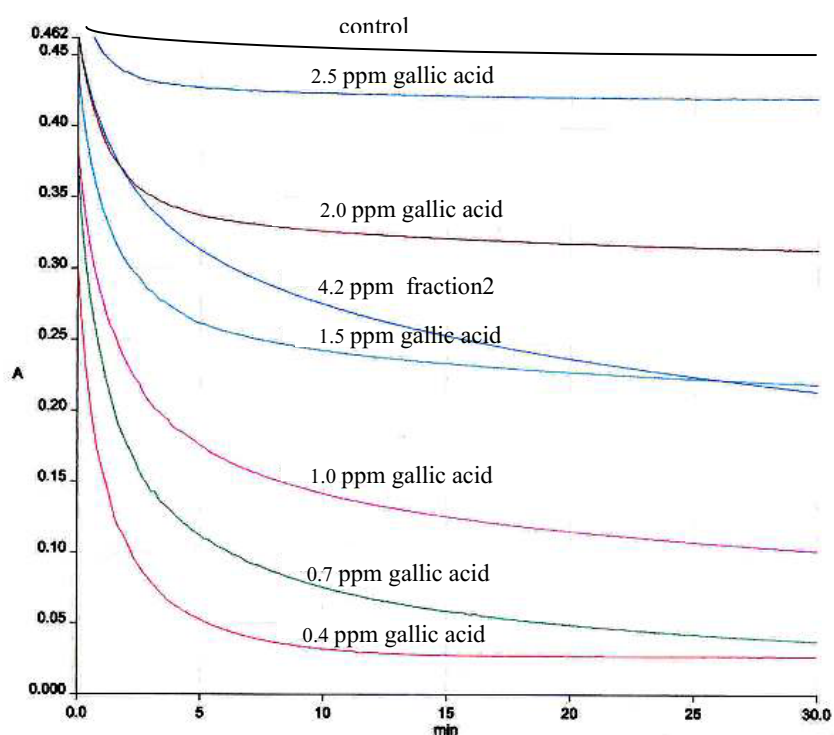
วิธีการทดลอง

บันทึก Spectrum (Abs. vs λ ในช่วงความยาวคลื่น 350-900 nm) ของสารละลาย DPPH reagent และ DPPH reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เข้มข้น 0.7 ppm และสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน fraction2 เข้มข้น 4.23 ppm แสดงในรูปที่ 3.27 จากนั้นบันทึก absorbance ที่ความยาวคลื่น 517 nm เทียบกับเวลาเพื่อศึกษา Kinetic curves ของ DPPH radical ผสมกับสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน fraction2 เข้มข้น 4.23 ppm ของพิกุลผลอ่อน และ DPPH radical ผสมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่างๆโดยใช้ Blank เป็นน้ำ ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 3.28 จากค่า absorbance คำนวณอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆแล้วนำอัตราการเกิดปฏิกิริยา ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) มาพลอตกับเวลา ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.20 และรูปที่ 3.29

ผลการทดลอง



รูปที่ 3.27 Spectra ของ DPPH radical และ DPPH radical ผสมกับสารมาตรฐาน gallic acid และ สารสกัดพิกุล



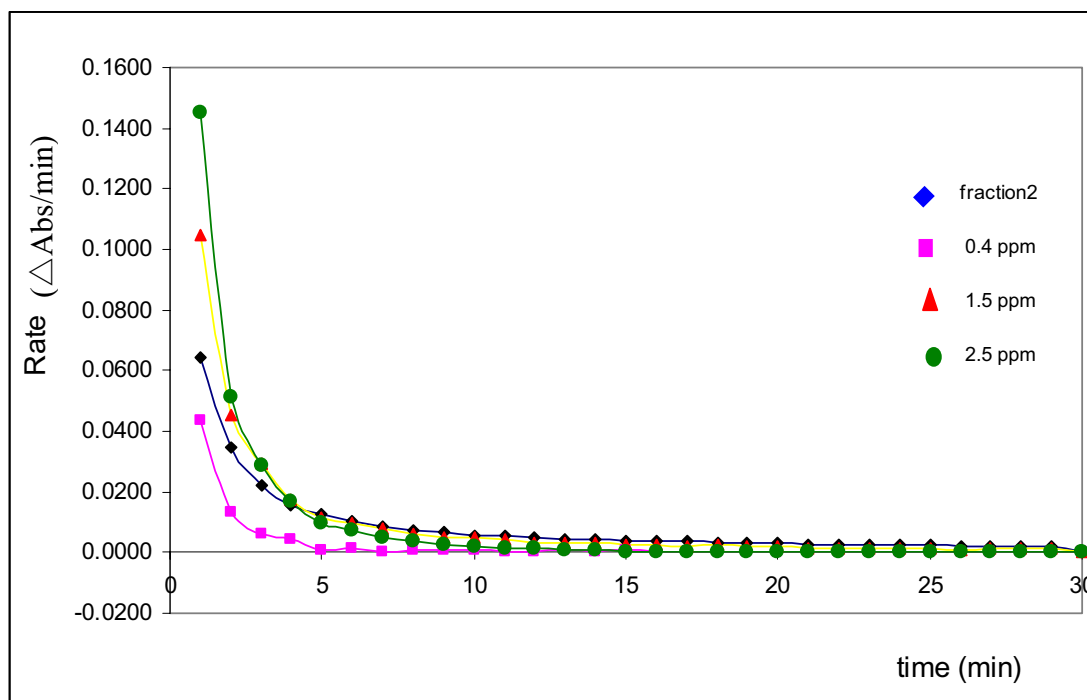
รูปที่ 3.28 Kinetic curve ของ DPPH radical ผสมกับสารสกัด fraction2 ของพิกุลผลอ่อน และ DPPH radical ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid

ตารางที่ 3.20 ค่า absorbance และอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆของ DPPH radical ผสมกับสารสกัด fraction2 ของพิกุลผลอ่อน และ DPPH radical ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid

เวลา s	fraction2 เข้มข้น 4.2 ppm		gallic acid เข้มข้น 0.4 ppm		gallic acid เข้มข้น 1.5 ppm		gallic acid เข้มข้น 2.5 ppm	
	Abs.	rate	Abs.	rate	Abs.	rate	Abs.	rate
0	0.4622	-	0.4949	-	0.3835	-	0.3041	-
1	0.3978	0.0644	0.4514	0.0435	0.2789	0.1046	0.1587	0.1454
2	0.3632	0.0346	0.4379	0.0135	0.2335	0.0454	0.1077	0.0510
3	0.3412	0.0220	0.4318	0.0061	0.2043	0.0292	0.0791	0.0286
4	0.3254	0.0158	0.4290	0.0046	0.1868	0.0175	0.0623	0.0168
5	0.3128	0.0126	0.4272	0.0009	0.1751	0.0117	0.0527	0.0096
6	0.3028	0.0100	0.4263	0.0014	0.1652	0.0099	0.0453	0.0074
7	0.2942	0.0086	0.4249	0.0002	0.1575	0.0077	0.0403	0.0050
8	0.2869	0.0073	0.4247	0.0008	0.1512	0.0063	0.0365	0.0038
9	0.2803	0.0066	0.4239	0.0005	0.1461	0.0051	0.0338	0.0027
10	0.2747	0.0056	0.4234	0.0005	0.1414	0.0047	0.0319	0.0019
11	0.2693	0.0054	0.4229	0.0003	0.1372	0.0042	0.0303	0.0016
12	0.2645	0.0048	0.4226	0.0002	0.1338	0.0034	0.0292	0.0011
13	0.2604	0.0041	0.4224	0.0005	0.1307	0.0031	0.0284	0.0008
14	0.2563	0.0041	0.4219	0.0002	0.1277	0.0030	0.0278	0.0006
15	0.2525	0.0038	0.4217	0.0005	0.1251	0.0026	0.0276	0.0002
16	0.2490	0.0035	0.4212	0.0002	0.1227	0.0024	0.0272	0.0004
17	0.2454	0.0036	0.4210	0.0001	0.1207	0.0020	0.0270	0.0002
18	0.2423	0.0031	0.4209	0.0002	0.1184	0.0023	0.0270	0.0000
19	0.2394	0.0029	0.4207	0.0001	0.1165	0.0019	0.0270	0.0000
20	0.2364	0.0030	0.4206	0.0001	0.1147	0.0018	0.0269	0.0001
21	0.2336	0.0028	0.4207	0.0004	0.1132	0.0015	0.0270	0.0001
22	0.2311	0.0025	0.4203	0.0000	0.1116	0.0016	0.0269	0.0001
23	0.2287	0.0024	0.4203	0.0002	0.1100	0.0016	0.0268	0.0001

ตารางที่ 3.19 ต่อ

24	0.2262	0.0025	0.4201	0.0002	0.1086	0.0014	0.0269	0.0001
25	0.2238	0.0024	0.4199	0.0001	0.1072	0.0014	0.0270	0.0001
26	0.2218	0.0020	0.4200	0.0001	0.1062	0.0010	0.0269	0.0001
27	0.2196	0.0022	0.4201	0.0001	0.1047	0.0015	0.0270	0.0001
28	0.2176	0.0020	0.4200	0.0000	0.1035	0.0012	0.0271	0.0001
29	0.2155	0.0021	0.4200	0.0001	0.1024	0.0011	0.0269	0.0002
30	0.2137	0.0001	0.4199	0.0001	0.1013	0.0000	0.0271	0.0000



รูปที่ 3.29 พล็อตระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับเวลาของ DPPH radical + fraction2 ของพิกุลผลอ่อน และ DPPH radical + สารละลายมาตรฐาน gallic acid

พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของสารสกัดและสารมาตรฐานกับ DPPH radical มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 นาที และมีค่าเกือบเท่ากันหลังจากเวลา 5 นาที และต่างกันน้อยมากหลังจาก 10 นาทีเป็นต้นไป จึงเลือกใช้เวลาที่ 10 นาที เพื่อการตรวจวัดปริมาณ DPPH radical ที่เหลือหลังจากปฏิกิริยาได้

3.4.1.3 การศึกษา antioxidant activity ของสารละลายมาตรฐานโดย DPPH assay

วิธีการทดลอง

วิเคราะห์ antioxidant capacity ของสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid, caffeic acid, catechin, catechol, EGCG, gallic acid และ trolox โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด ปริมาตรต่าง ๆ กัน ผสมกับสารละลาย DPPH reagent 4.50 mL ดังตารางที่ 3.21 ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้มีปริมาตรรวมเป็น 5 mL เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ 517 nm โดยใช้ Blank เป็น deionized water และ Control เป็นสารละลายผสม DPPH reagent 4.50 mL กับ deionized water 0.50 mL ค่า Absorbance ที่วัดได้สามารถนำมาคำนวณค่า % Remaining DPPH[•] ตามสมการที่ 3.1 ผลค่า % Remaining DPPH[•] แสดงในตารางที่ 3.22 - 3.28 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 3.30 จากกราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเพื่อใช้หาค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่ทำให้ % Remaining DPPH[•] = 50%

ตารางที่ 3.21 ปริมาตรของ DPPH reagent กับสารละลายมาตรฐานอย่างละ 100 ppm ของ ascorbic acid, caffeic acid, catechin, catechol, EGCG, gallic acid และ trolox โดย DPPH assay

หลอดที่	ปริมาตร DPPH (mL)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน (μL)						
		ascorbic acid	caffeic acid	catechin	catechol	EGCG	gallic acid	trolox
1	4.50	75	35	50	20	35	20	50
2	4.50	100	50	100	35	50	35	100
3	4.50	125	75	150	50	75	50	150
4	4.50	150	100	200	75	100	75	200
5	4.50	175	125	250	100	125	100	250
6	4.50	200	150	300	125	150	125	300
Control	4.50	-	-	-	-	-	-	-

เมื่อนำไปวัดค่า Abs₅₁₇ จะสามารถคำนวณ % Remaining DPPH[•] ตามสมการ 3.1

$$\% \text{ Remaining DPPH}^{\bullet} = \frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{—————} \quad 3.1$$

ผลการทดลอง

ตารางที่ 3.22 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ ascorbic acid โดย DPPH assay (n = 5)

หลอดที่	$A_{517 \text{ nm}} (\bar{x})$	Final conc. Ascorbic acid (ppm)	%Remaining ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
1	0.3047	1.50	58.42 $\pm$ 1.59
2	0.2342	2.00	44.91 $\pm$ 2.13
3	0.1528	2.50	29.30 $\pm$ 3.02
4	0.0908	3.00	17.41 $\pm$ 3.61
5	0.0281	3.50	5.38 $\pm$ 1.38
6	0.0205	4.00	3.93 $\pm$ 0.36
Control	0.5215	-	-

ตารางที่ 3.23 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ caffeic acid โดย DPPH assay (n = 5)

หลอดที่	$A_{517 \text{ nm}} (\bar{x})$	Final conc. caffeic acid (ppm)	%Remaining ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
1	0.4663	0.7	80.78 $\pm$ 0.53
2	0.4229	1.0	73.25 $\pm$ 0.90
3	0.3446	1.5	59.70 $\pm$ 0.61
4	0.2763	2.0	47.86 $\pm$ 1.70
5	0.1985	2.5	34.38 $\pm$ 0.33
6	0.1339	3.0	23.19 $\pm$ 0.47
Control	0.5773	-	-

ตารางที่ 3.24 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ catechin โดย DPPH assay
(n = 5)

หลอดที่	$A_{517\text{ nm}} (\bar{x})$	Final conc.catechin (ppm)	%Remaining ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
1	0.4216	1.0	79.72 $\pm$ 0.57
2	0.3263	2.0	61.71 $\pm$ 0.69
3	0.2265	3.0	42.82 $\pm$ 1.45
4	0.1367	4.0	25.85 $\pm$ 1.16
5	0.0699	5.0	13.23 $\pm$ 0.62
6	0.0365	6.0	6.90 $\pm$ 0.16
Control	0.5289	-	-

ตารางที่ 3.25 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ catechol โดย DPPH assay
(n = 5)

หลอดที่	$A_{517\text{ nm}} (\bar{x})$	Final conc. catechol (ppm)	%Remaining ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
1	0.3691	0.4	70.72 $\pm$ 1.34
2	0.2753	0.7	52.71 $\pm$ 2.96
3	0.1902	1.0	36.37 $\pm$ 2.61
4	0.0571	1.5	10.92 $\pm$ 3.74
5	0.0270	2.0	5.20 $\pm$ 0.57
6	0.0252	2.5	4.82 $\pm$ 0.37
Control	0.5220	-	-

ตารางที่ 3.26 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ EGCG โดย DPPH assay
(n = 5)

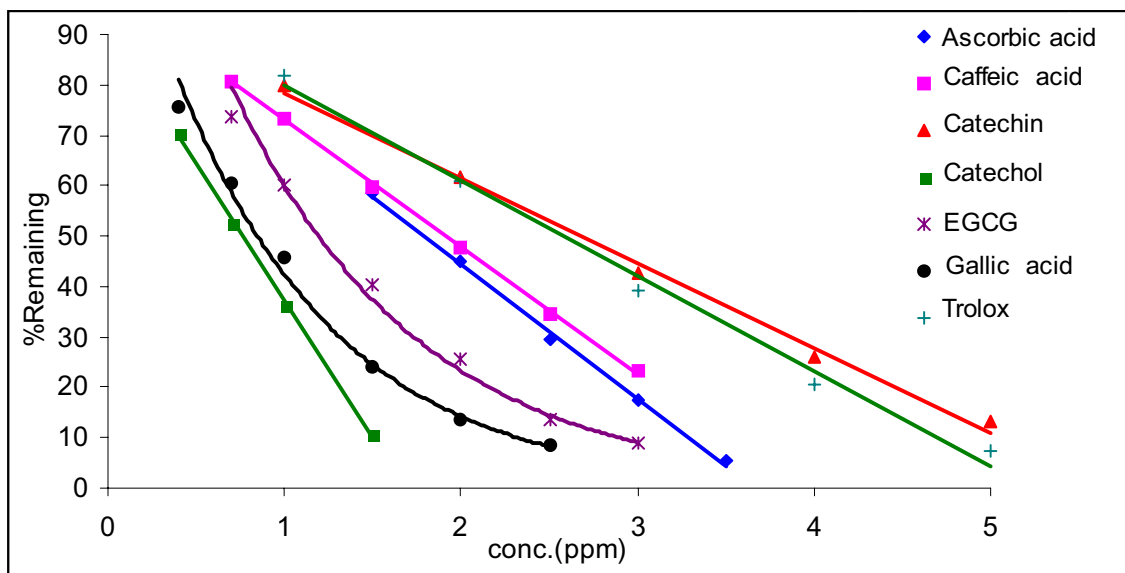
หลอดที่	$A_{517\text{ nm}} (\bar{x})$	Final conc. EGCG (ppm)	%Remaining ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
1	0.3811	0.7	73.52 $\pm$ 1.08
2	0.3110	1.0	60.04 $\pm$ 0.77
3	0.2090	1.5	40.41 $\pm$ 1.86
4	0.1334	2.0	25.74 $\pm$ 2.30
5	0.0702	2.5	13.42 $\pm$ 0.91
6	0.0461	3.0	8.78 $\pm$ 0.31
Control	0.5182	-	-

ตารางที่ 3.27 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ gallic acid โดย DPPH assay
(n = 5)

หลอดที่	$A_{517\text{ nm}} (\bar{x})$	Final conc.gallic acid (ppm)	%Remaining ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
1	0.4311	0.4	75.80 $\pm$ 1.03
2	0.3439	0.7	60.64 $\pm$ 0.90
3	0.2600	1.0	45.85 $\pm$ 1.17
4	0.1366	1.5	24.08 $\pm$ 0.97
5	0.0765	2.0	13.48 $\pm$ 0.55
6	0.0476	2.5	8.40 $\pm$ 0.28
Control	0.5000	-	-

ตารางที่ 3.28 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ trolox โดย DPPH assay (n = 5)

หลอดที่	$A_{517\text{ nm}} (\bar{x})$	Final conc. trolox (ppm)	%Remaining ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
1	0.4094	1.0	81.87 $\pm$ 0.67
2	0.3058	2.0	60.74 $\pm$ 1.61
3	0.2007	3.0	39.33 $\pm$ 2.70
4	0.1030	4.0	20.60 $\pm$ 3.40
5	0.0375	5.0	7.50 $\pm$ 1.09
6	0.0233	6.0	4.66 $\pm$ 0.59
Control	0.5001	-	-



รูปที่ 3.30 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด โดย DPPH assay

คำนวณค่า EC_{50} จากสมการที่ได้จากการพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining DPPH[•] (แกน y) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานชนิดต่างๆ (แกน x) ค่า EC_{50} แสดงในตารางที่ 3.29

ตารางที่ 3.29 สมการ, R^2 และ EC_{50} ของสารละลายมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง

สารละลายมาตรฐาน	สมการ	R^2	ค่า EC_{50} (ppm)
ascorbic acid	$y = -26.72x + 97.870$	0.9972	1.792
caffeic acid	$y = -25.22x + 98.176$	0.9994	1.910
catechin	$y = -16.74x + 95.028$	0.9937	2.684
catechol	$y = -54.11x + 91.380$	0.9985	0.765
EGCG	$y = 154.69e^{-0.95x}$	0.9917	1.192
gallic acid	$y = 128.10e^{1.11x}$	0.9945	0.846
trolox	$y = -18.88x + 95.030$	0.9920	2.577

จากการทดลองสรุปค่า EC_{50} จากน้อยไปมากได้ดังนี้ catechol < gallic acid < EGCG < ascorbic acid < caffeic acid < trolox < catechin

ค่า EC_{50} น้อยแสดงว่าสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำๆก็สามารถลด DPPH[•] ลง 50% ดังนั้นสารละลายมาตรฐานนี้จึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งจะได้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อยดังนี้ catechol > gallic acid > EGCG > ascorbic acid > caffeic acid > trolox > catechin

3.4.1.4 การศึกษา antioxidant activity ของสารสกัดจากพิกุลโดย DPPH assay

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลอง 3.4.1.3 โดยเปลี่ยนจากที่ใช้สารละลายมาตรฐานเป็นสารสกัดจากผลพิกุล

3.4.1.4.1 Crude extract

ปริมาตรของสารสกัดจาก crude extract ในข้อ 3.1.2 ของพิกุลระยะผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุกที่เจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว ปริมาตรต่างๆกันที่ผสมกับสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 4.50 mL แสดงดังตารางที่ 3.30

ตารางที่ 3.30 ปริมาตรของสารสกัดจาก crude extract ของพิกุลระยะผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก กับสารละลาย DPPH reagent

หลอดที่	ปริมาตร DPPH reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μL)		
		ผลอ่อน (588.28 ppm)	ผลแก่จัด (588.24 ppm)	ผลสุก (1176.7 ppm)
1	4.50	10	20	20
2	4.50	20	40	40
3	4.50	30	60	60
4	4.50	40	80	80
5	4.50	50	100	100
Control	4.50	-	-	-

ผลการทดลอง

สำหรับผลพิกุลแต่ละชนิดซึ่งค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) แสดงในตารางที่ 3.31 – 3.33 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัด แสดงในรูป 3.31 – 3.33

ตารางที่ 3.31 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) ของผลพิกุลอ่อน ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

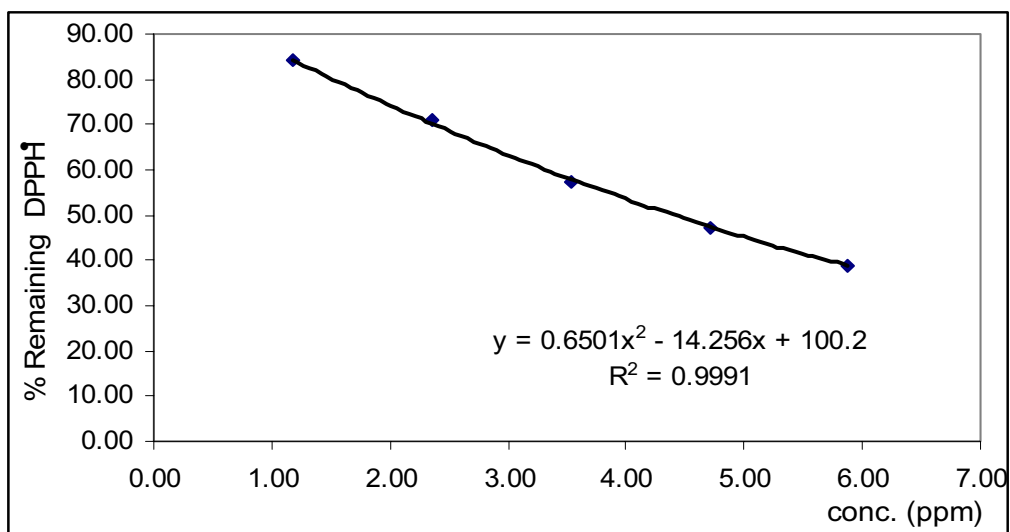
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
1.17	0.5441	86.02	0.5399	86.18	0.5294	83.97	0.5313	84.09	0.5302	85.28
2.35	0.4628	73.17	0.4499	71.81	0.4507	71.48	0.4493	71.11	0.4602	74.02
3.53	0.3855	60.95	0.3859	61.60	0.3798	60.24	0.3626	57.39	0.3902	62.76
4.71	0.302	47.75	0.3029	48.35	0.3019	47.88	0.2996	47.42	0.2925	47.05
5.88	0.239	37.79	0.2514	40.13	0.2319	36.78	0.2462	38.97	0.2505	40.29
Control	0.6325	-	0.6265	-	0.6305	-	0.6318	-	0.6217	-

ตารางที่ 3.32 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) ของผลพิกุลแก่จัด ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

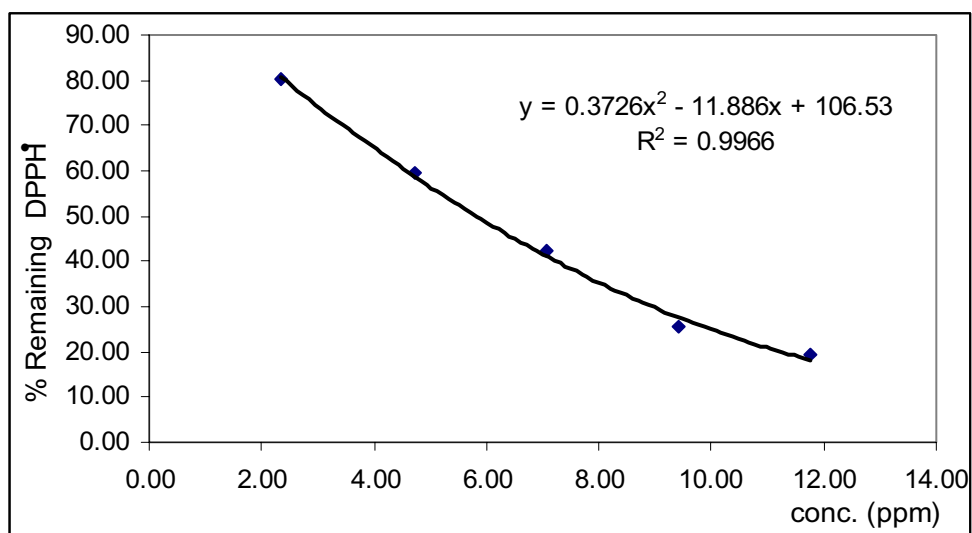
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
2.35	0.5037	80.16	0.4976	80.09	0.4996	80.19	0.4904	79.12	0.4866	79.32
4.71	0.3711	59.05	0.3701	59.57	0.3684	59.13	0.3595	58.00	0.3556	57.96
7.06	0.2694	42.87	0.2632	42.36	0.2509	40.27	0.2513	40.55	0.2431	39.63
9.41	0.1583	25.19	0.1576	25.37	0.1602	25.71	0.1507	24.31	0.1433	23.36
11.76	0.1102	17.54	0.1196	19.25	0.1010	16.21	0.1063	17.15	0.0981	15.99
Control	0.6284	-	0.6213	-	0.6230	-	0.6198	-	0.6135	-

ตารางที่ 3.33 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) ของผลพิกุลสุก ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

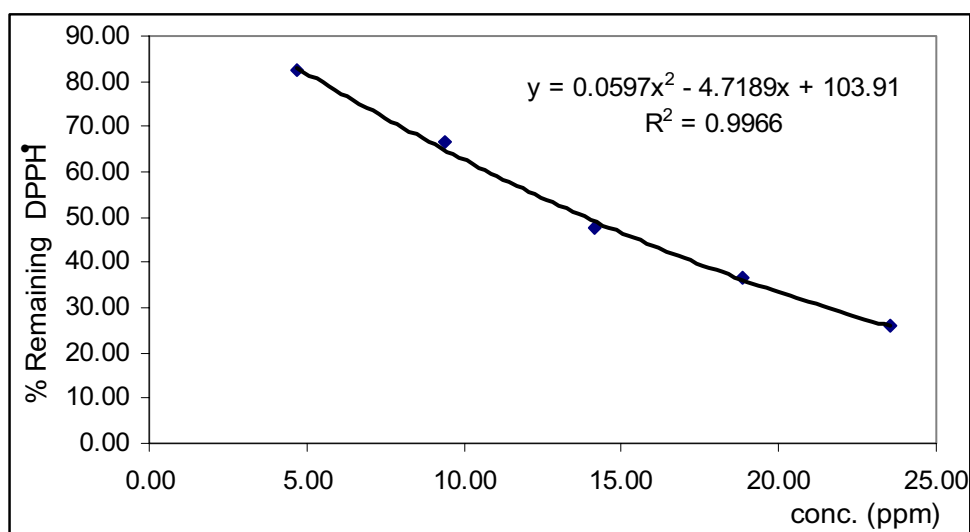
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
4.71	0.5152	81.99	0.5153	82.37	0.5204	83.12	0.5178	82.44	0.5065	81.72
9.41	0.4175	66.44	0.4169	66.64	0.4316	68.93	0.4204	66.93	0.4040	65.18
14.12	0.3223	51.29	0.2969	47.46	0.3103	49.56	0.3239	51.57	0.3020	48.73
18.83	0.2128	33.86	0.2295	36.68	0.2363	37.74	0.2254	35.89	0.2395	38.64
23.54	0.1607	25.57	0.1625	25.98	0.1920	30.67	0.2273	36.19	0.1763	28.44
Control	0.6284	-	0.6256	-	0.6261	-	0.6281	-	0.6198	-



รูปที่ 3.31 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิทูลอ่อน



รูปที่ 3.32 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิทูลแก่จัด



รูปที่ 3.33 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิบูลสุก

คำนวณค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิบูล ผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุกแสดงดังตารางที่ 3.34

ตารางที่ 3.34 ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิบูลผลอ่อน ผลแก่จัดและ ผลสุกโดยวิธี DPPH assay

ครั้งที่	EC_{50} (ppm)		
	ผลอ่อน	ผลแก่จัด	ผลสุก
1	4.60	6.19	14.24
2	4.71	6.12	14.26
3	4.53	6.05	14.75
4	4.54	5.95	14.56
5	4.72	5.89	14.66

จากผลการทดลองพบว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิบูลสุก > ผลแก่จัด > ผลอ่อน ตามลำดับสรุปความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ผลอ่อน > ผลแก่จัด > ผลสุกตามลำดับ

3.4.1.4.2 สารประกอบฟีนอลจากผลพิกุลระยะผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3

ใช้สารสกัดจากผลพิกุลระยะผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 ที่ปริมาตรต่าง ๆ กันที่ผสมกับสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 4.50 mL แสดงดังตารางที่ 3.35

ตารางที่ 3.35 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย DPPH reagent

หลอดที่	ปริมาตร DPPH reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μ L)		
		F1 (10910 ppm)	F2 (423.52 ppm)	F3 (705.6 ppm)
1	4.50	10	10	20
2	4.50	20	30	40
3	4.50	30	50	60
4	4.50	40	70	80
5	4.50	50	90	100
Control	4.50	-	-	-

ผลการทดลอง

ค่า absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) แสดงในตารางที่ 3.36 – 3.38 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดแสดงในรูป 3.34 – 3.36

ตารางที่ 3.36 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) ของ fraction 1 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

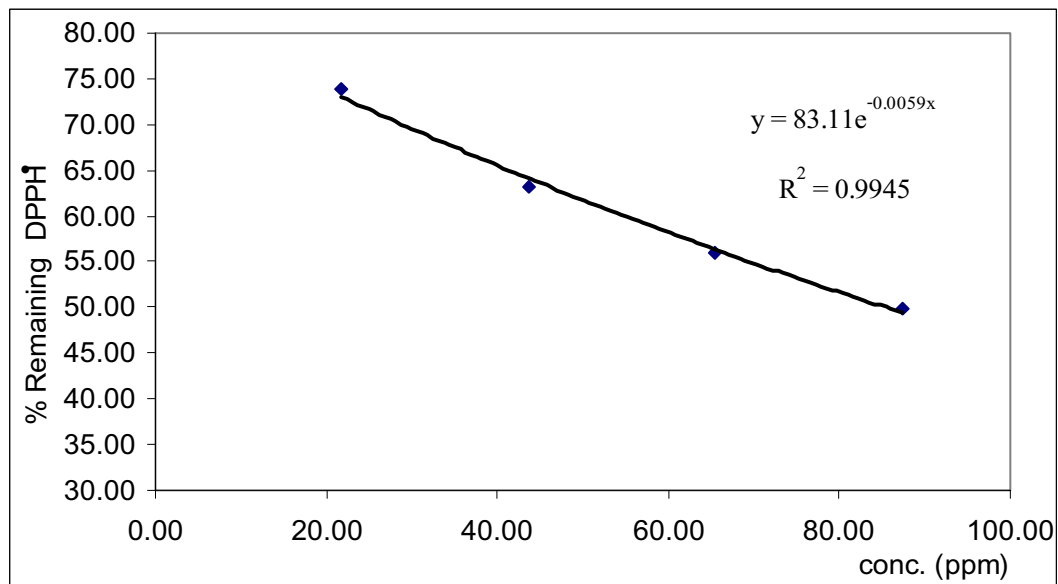
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
21.80	0.5798	73.35	0.5146	72.01	0.5277	75.78	0.5454	73.88	0.5384	73.66
43.60	0.5006	62.70	0.4304	62.62	0.4397	63.18	0.4544	63.18	0.4762	62.46
65.50	0.4181	55.13	0.3818	54.52	0.3870	56.01	0.4071	56.00	0.3963	56.63
87.30	0.3441	49.64	0.3190	50.12	0.3339	49.89	0.3445	49.89	0.3528	49.04
109.10	0.2959	47.04	0.2690	45.13	0.2830	45.67	0.3098	45.67	0.3075	42.22
Control	0.6346	-	0.5990	-	0.5826	-	0.6217	-	0.6267	-

ตารางที่ 3.37 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) ของ fraction 2 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

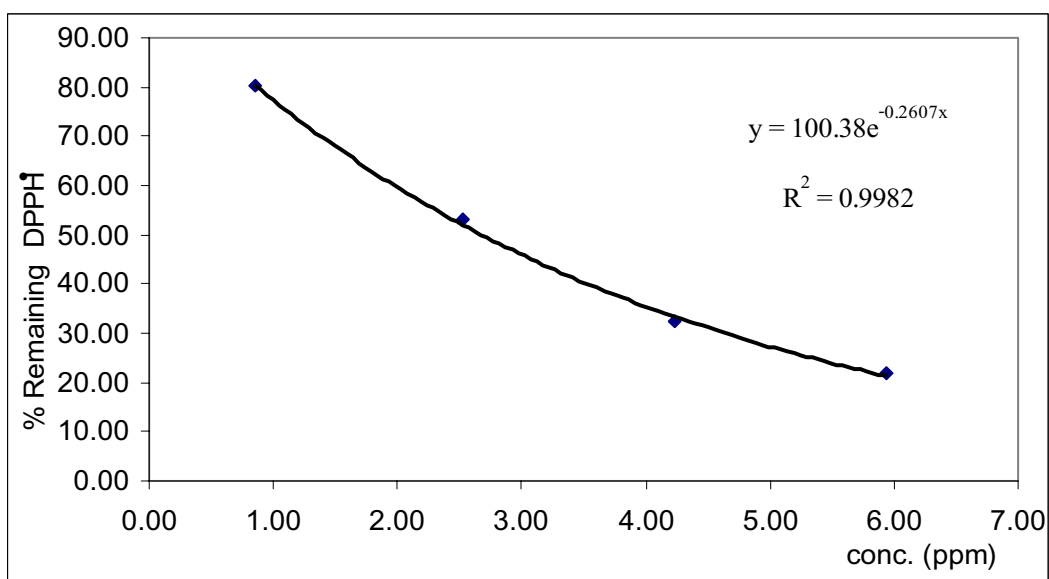
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
0.85	0.5063	78.44	0.5423	81.35	0.5379	79.03	0.5041	80.24	0.5131	77.81
2.52	0.3873	53.94	0.3695	55.94	0.3683	53.67	0.3296	53.09	0.3437	52.70
4.23	0.2907	36.65	0.2598	35.74	0.2601	31.92	0.2481	32.25	0.2428	34.84
5.93	0.1982	21.83	0.1618	22.01	0.1687	21.40	0.1316	21.73	0.1691	21.03
7.62	0.1574	14.01	0.1344	16.74	0.1216	16.89	0.1019	14.38	0.1155	14.92
control	0.6330	-	0.6264	-	0.6268	-	0.5946	-	0.5919	-

ตารางที่ 3.38 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) ของ fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

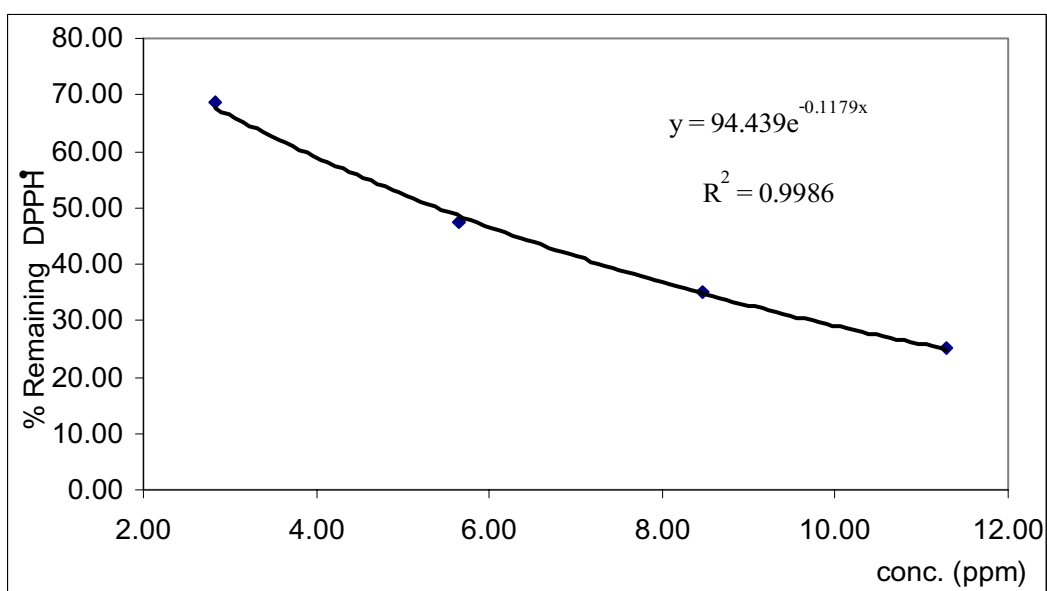
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
2.82	0.4663	69.92	0.4611	68.62	0.4658	67.12	0.4585	66.56	0.4588	69.94
5.64	0.3702	48.70	0.3567	47.40	0.3537	44.87	0.3347	48.53	0.3534	47.32
8.47	0.2549	35.51	0.2741	35.06	0.2681	33.67	0.2663	34.82	0.2606	35.93
11.29	0.2071	27.20	0.1959	25.03	0.2084	25.30	0.1972	27.52	0.2021	25.49
14.11	0.1499	22.28	0.1427	20.93	0.1449	22.71	0.1421	19.55	0.1468	22.01
control	0.5969	-	0.5924	-	0.5929	-	0.5910	-	0.5950	-



รูปที่ 3.34 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิบูลอ่อน fraction 1



รูปที่ 3.35 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิศุล
อ่อน fraction 2



รูปที่ 3.36 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิศุล
อ่อน fraction 3

EC₅₀ ของสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 แสดงดังตารางที่ 3.39

ตารางที่ 3.39 ค่า EC₅₀ ของสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดย DPPH assay (n = 5)

ครั้งที่	EC ₅₀ (ppm)		
	F1	F2	F3
1	83.27	2.78	5.62
2	85.14	2.84	5.39
3	83.35	2.65	5.10
4	86.12	2.67	5.39
5	84.68	2.67	5.51
เฉลี่ย $\pm$ SD	84.51 $\pm$ 1.21	2.72 $\pm$ 0.08	5.40 $\pm$ 0.19

จากผลการทดลองพบว่าค่า EC₅₀ ของสารสกัดพิกุลผลอ่อน F1 > F3 > F2 สรุป
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อยได้ดังนี้ F2 > F3 > F1

3.4.1.4.3 สารประกอบฟีนอลจากผลพิกุลระยะผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3

ใช้สารสกัดจากผลพิกุลระยะผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 ที่ปริมาตรต่าง ๆ กันที่ผสมกับสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 4.50 mL แสดงดังตารางที่ 3.40

ตารางที่ 3.40 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย DPPH reagent

หลอดที่	ปริมาตร DPPH reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μ L)		
		F1 (3550 ppm)	F2 (327.2 ppm)	F3 (957.2 ppm)
1	4.50	30	10	10
2	4.50	50	30	20
3	4.50	70	50	30
4	4.50	90	70	40
5	4.50	120	90	50
Control	4.50	-	-	-

ผลการทดลอง

ค่า absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) แสดงในตารางที่ 3.41– 3.43 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดแสดงในรูป 3.37– 3.39

ตารางที่ 3.41 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ fraction 1 ครั้งที่ 1 – 5 วิธี

DPPH assay

Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
21.30	0.4332	73.35	0.4257	72.01	0.4443	75.78	0.4248	73.88	0.4243	73.66
35.50	0.3703	62.70	0.3702	62.62	0.3728	63.59	0.3633	63.18	0.3598	62.47
49.70	0.3256	55.13	0.3223	54.52	0.3284	56.01	0.3220	56.00	0.3262	56.63
63.90	0.2932	49.64	0.2957	50.02	0.2896	49.39	0.2869	49.90	0.2825	49.05
85.20	0.2778	47.04	0.2668	45.13	0.2417	41.22	0.2626	45.67	0.2432	42.22
Control	0.5906	-	0.5912	-	0.5863	-	0.5750	-	0.5760	-

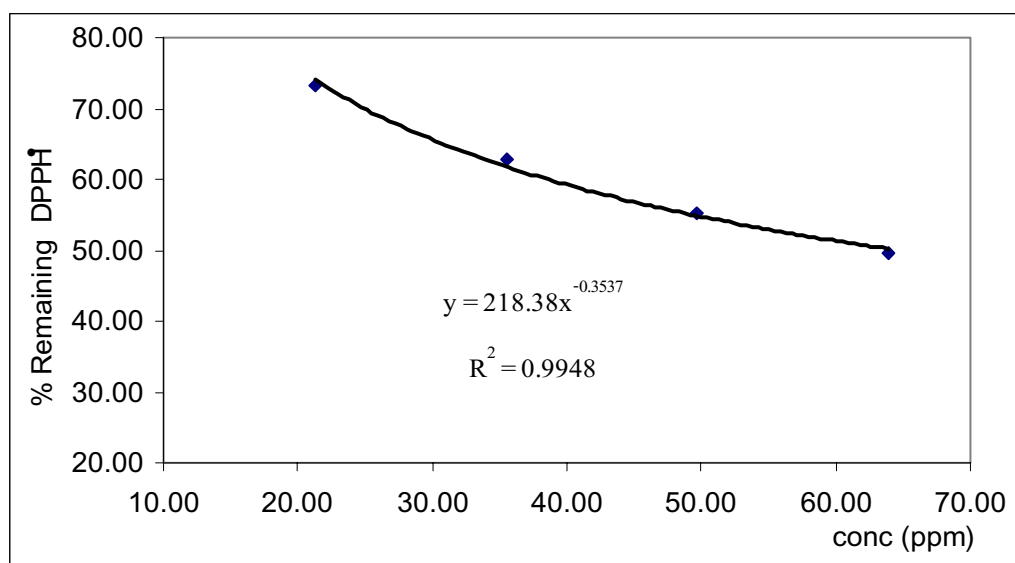
ตารางที่ 3.42 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ fraction 2 ครั้งที่ 1 – 5 โดย

DPPH assay

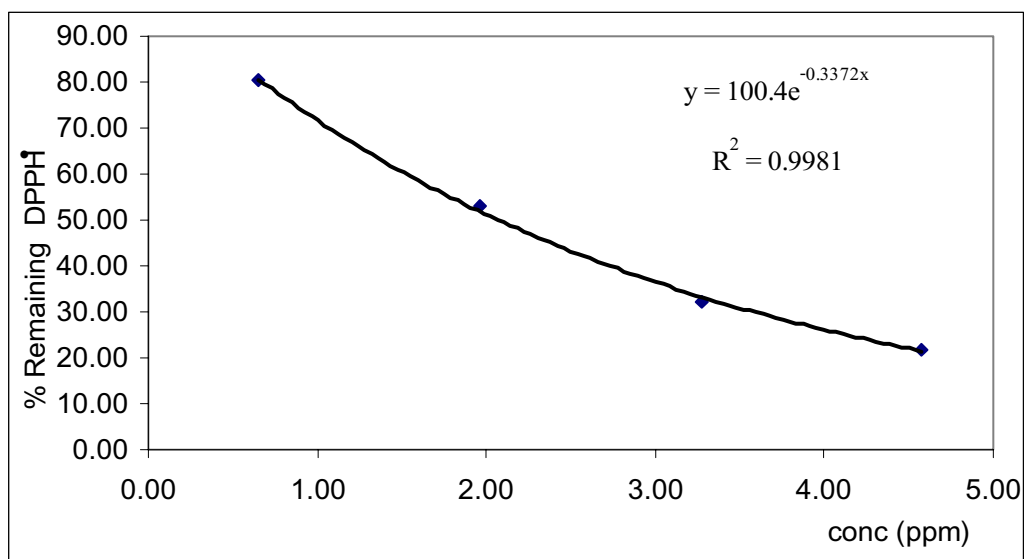
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
0.65	0.4620	78.44	0.4723	81.35	0.4575	79.03	0.4620	80.24	0.4547	77.81
1.96	0.3177	53.94	0.3248	55.94	0.3107	53.67	0.3057	53.09	0.3080	52.70
3.27	0.2159	36.66	0.2075	35.74	0.1848	31.92	0.1857	32.25	0.2036	34.84
4.58	0.1286	21.83	0.1278	22.01	0.1239	21.40	0.1251	21.73	0.1229	21.03
5.89	0.0825	14.01	0.0972	16.74	0.0978	16.89	0.0828	14.38	0.0872	14.92
control	0.5890	-	0.5806	-	0.5789	-	0.5758	-	0.5844	-

ตารางที่ 3.43 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

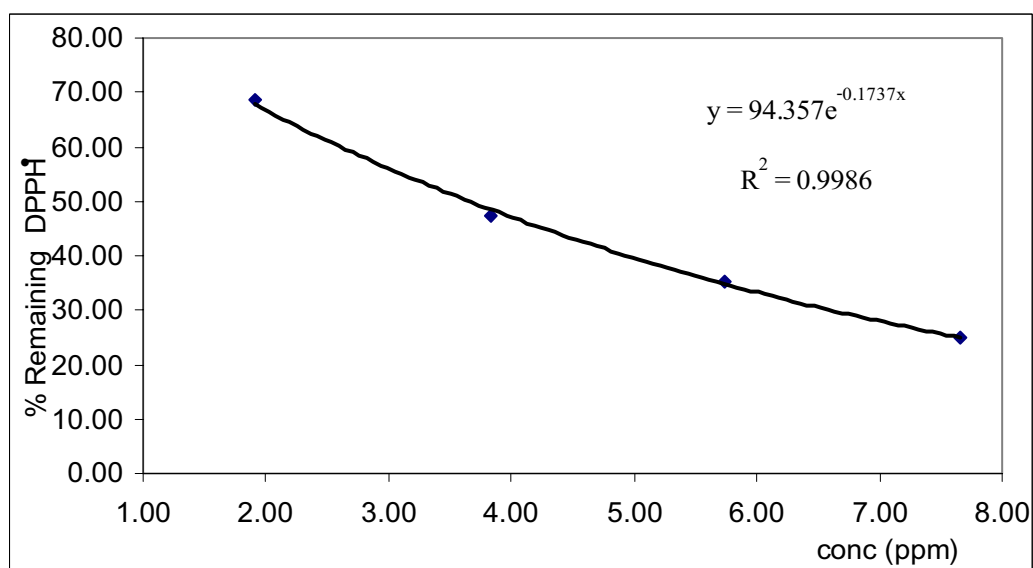
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
1.91	0.3995	69.94	0.3954	68.62	0.3810	67.12	0.3838	66.56	0.4020	69.94
3.83	0.2783	47.32	0.2731	47.40	0.2547	44.87	0.2798	48.53	0.2720	47.32
5.74	0.2029	35.93	0.2020	35.06	0.1911	33.67	0.2008	34.82	0.2065	35.93
7.66	0.1554	25.49	0.1442	25.03	0.1436	25.30	0.1587	27.52	0.1465	25.49
9.57	0.1273	22.01	0.1206	20.93	0.1289	22.71	0.1127	19.55	0.1265	22.01
control	0.5714	-	0.5762	-	0.5676	-	0.5766	-	0.5748	-



รูปที่ 3.37 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลแก่
จัด fraction 1



รูปที่ 3.38 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลแก่
จัด fraction 2



รูปที่ 3.39 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลแก่
จัด fraction 3

ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิกุลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 แสดงดังตารางที่ 3.44

ตารางที่ 3.44 ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิกุลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี DPPH assay (n = 5)

ครั้งที่	EC_{50} (ppm)		
	F1	F2	F3
1	64.58	2.14	3.81
2	65.17	2.20	3.66
3	62.84	2.04	3.46
4	66.35	2.07	3.66
5	64.98	2.06	3.74
เฉลี่ย $\pm$ SD	64.78 $\pm$ 1.27	2.10 $\pm$ 0.07	3.67 $\pm$ 0.13

จากค่า EC_{50} พบว่าสารสกัดผลพิกุลแก่จัด $F1 > F3 > F2$ สรุปความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อยได้ดังนี้ $F2 > F3 > F1$

3.4.1.4.4 สารสกัดจากผลพืกระยะผลสุก fraction 1, 2 และ 3

ใช้สารสกัดจากผลพืกระยะผลสุก fraction 1, 2 และ 3 ที่ปริมาตรต่าง ๆ กันที่ผสมกับสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 4.50 mL แสดงดังตารางที่ 3.45

ปริมาตรของสารสกัดจากผลพืกระยะผลสุก fraction 1, 2 และ 3 ความเข้มข้นตั้งต้นเป็น 2930, 19356 และ 107022 ppm ตามลำดับ ปริมาตรต่าง ๆ กันที่ผสมกับสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 4.50 mL แสดงดังตารางที่ 3.46

ตารางที่ 3.45 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพืกระยะผลสุก fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย DPPH reagent

หลอดที่	ปริมาตร DPPH reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μL)		
		F1 (2930 ppm)	F2 (3871.2 ppm)	F3 (2140.4 ppm)
1	4.50	5	5	5
2	4.50	10	10	10
3	4.50	20	20	20
4	4.50	30	30	30
5	4.50	40	40	40
Control	4.50	-	-	-

ผลการทดลอง

ค่า absorbance และ % Remaining DPPH[•] (%R) แสดงในตารางที่ 3.46 – 3.48 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดแสดงในรูป 3.40 – 3.42

ตารางที่ 3.46 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ fraction 1 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

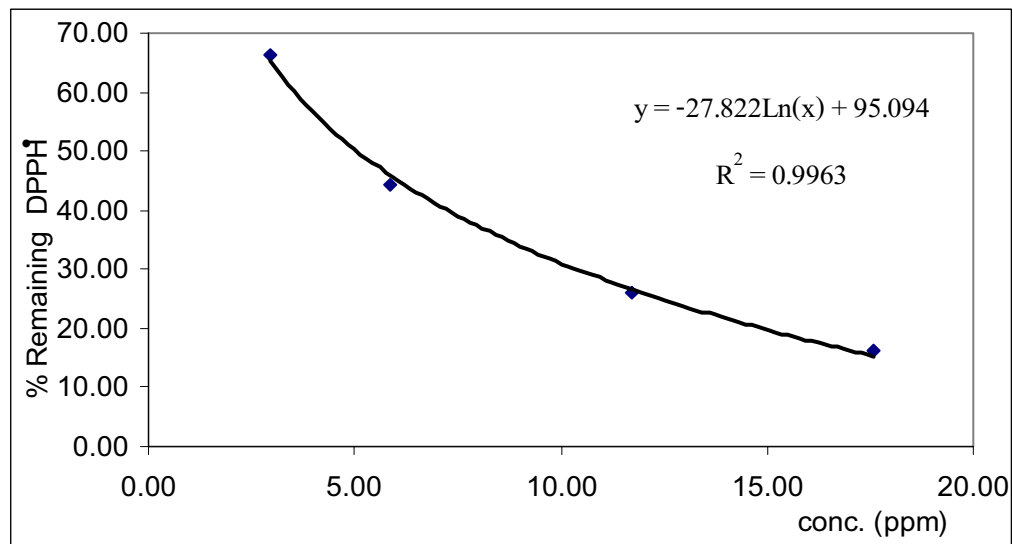
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
2.93	0.3309	63.16	0.3459	66.11	0.3396	62.83	0.3475	66.32	0.3276	62.77
5.86	0.2145	40.94	0.2210	42.24	0.2163	40.02	0.2319	44.26	0.2148	41.16
11.72	0.1072	20.46	0.1205	23.03	0.1208	22.35	0.1366	26.07	0.1175	22.51
17.58	0.0604	11.53	0.0718	13.72	0.0676	12.51	0.0859	16.39	0.0675	12.93
23.24	0.0345	6.59	0.0633	12.10	0.0558	10.32	0.0624	11.91	0.0468	8.97
Control	0.5239	-	0.5232	-	0.5405	-	0.5240	-	0.5219	-

ตารางที่ 3.47 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ fraction 2 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

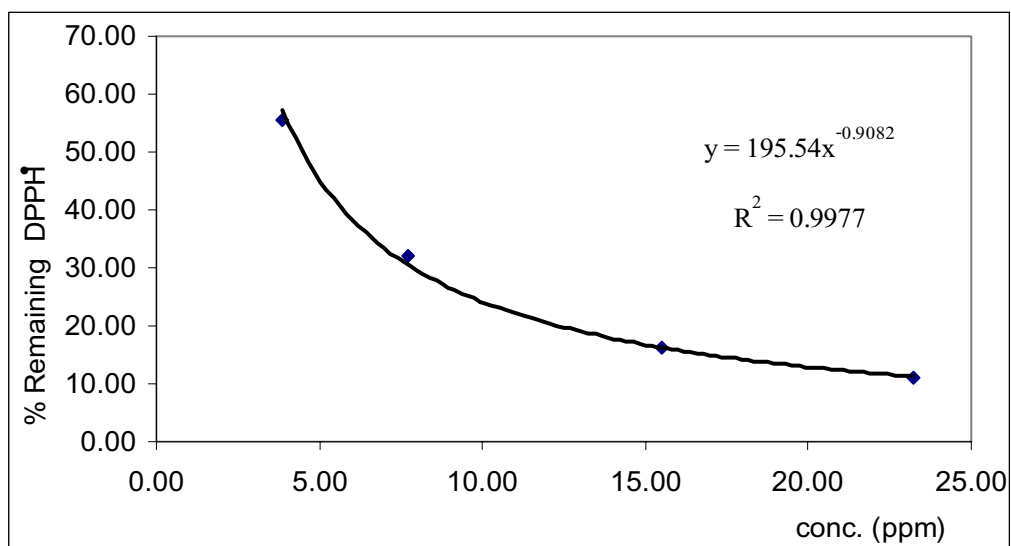
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
3.87	0.3386	58.69	0.3191	55.57	0.3181	57.62	0.3156	56.24	0.3154	55.40
7.74	0.1603	27.79	0.1838	32.01	0.1867	33.82	0.1725	30.74	0.2134	37.48
15.48	0.0931	16.14	0.0929	16.18	0.0897	16.25	0.0782	13.93	0.0974	17.11
23.23	0.0675	11.70	0.0635	11.06	0.0569	10.31	0.0613	10.92	0.0655	11.51
30.97	0.0607	10.52	0.0603	10.50	0.0575	10.41	0.0596	10.62	0.0604	10.61
control	0.5769	-	0.5742	-	0.5521	-	0.5612	-	0.5693	-

ตารางที่ 3.48 ค่า Absorbance และ % Remaining DPPH[•] ของ fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย DPPH assay

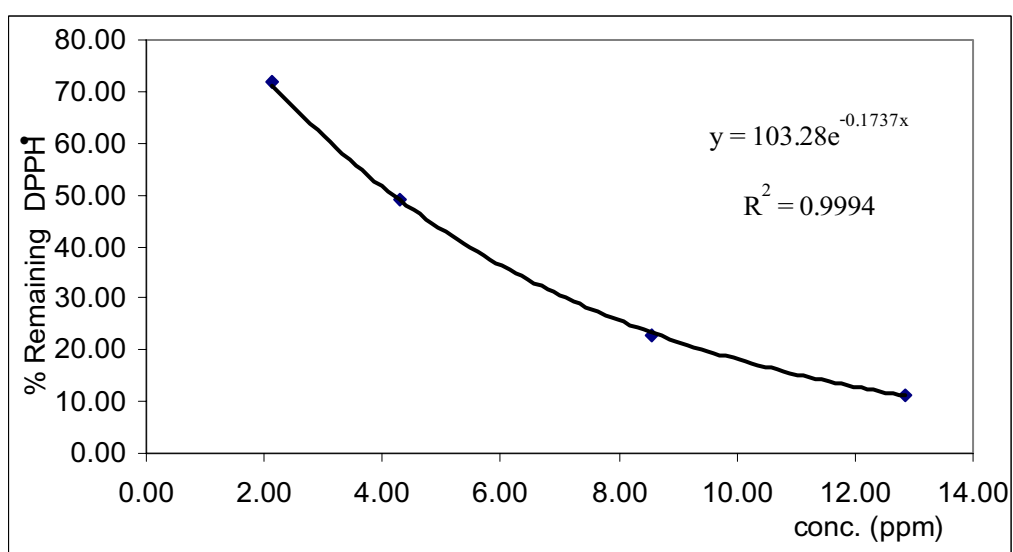
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining DPPH [•] (%R)									
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3		ครั้งที่4		ครั้งที่5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
2.14	0.4043	71.70	0.3918	68.71	0.3876	67.33	0.4216	71.93	0.4336	75.42
4.28	0.2686	47.63	0.2832	49.67	0.2677	46.50	0.2885	49.22	0.2781	48.37
8.56	0.1155	20.48	0.1228	21.54	0.1114	19.35	0.1329	22.68	0.1459	25.38
12.85	0.0618	10.96	0.0715	12.54	0.0685	11.90	0.0661	11.28	0.0834	14.51
17.13	0.0545	9.66	0.0548	9.61	0.0515	8.95	0.0542	9.25	0.0526	9.15
control	0.5639	-	0.5702	-	0.5757	-	0.5861	-	0.5749	-



รูปที่ 3.40 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลสุก fraction 1



รูปที่ 3.41 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลสุก fraction 2



รูปที่ 3.42 พล็อตระหว่าง % Remaining DPPH[•] (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลสุก fraction 3

ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิกุลสุก fraction 1, 2 และ 3 แสดงดังตารางที่ 3.49

ตารางที่ 3.49 ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิกุลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดย DPPH assay (n = 5)

ครั้งที่	EC_{50} (ppm)		
	F1	F2	F3
1	4.48	4.38	3.99
2	4.48	4.49	4.02
3	4.45	4.74	3.7
4	5.06	4.42	4.18
5	4.53	4.69	4.42
เฉลี่ย $\pm$ SD	4.60 $\pm$ 0.26	4.54 $\pm$ 0.16	4.06 $\pm$ 0.26

จากค่า EC_{50} พบว่าสารสกัดพิกุลสุก F1 $\approx$ F3 $\approx$ F2 (t-test ที่ P = 0.05) จากค่า EC_{50} แสดงว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสาม fraction ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.4.2 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging assay : (ABTS assay)

3.4.2.1 การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt)

ชั่ง ABTS 0.096 g ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 25 mL ในขวดปริมาตร

2. สารละลาย 140 mM potassium persulfate

ชั่ง potassium persulfate 0.9461 g ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 25 mL ในขวดปริมาตร

3. สารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ reagent

ผสมสารละลาย 7 mM ABTS reagent 5 mL กับ 140 mM potassium persulfate 88 μ l ตั้งทิ้งไว้ 16 ชั่วโมงในที่มืด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water เป็น 25 ml

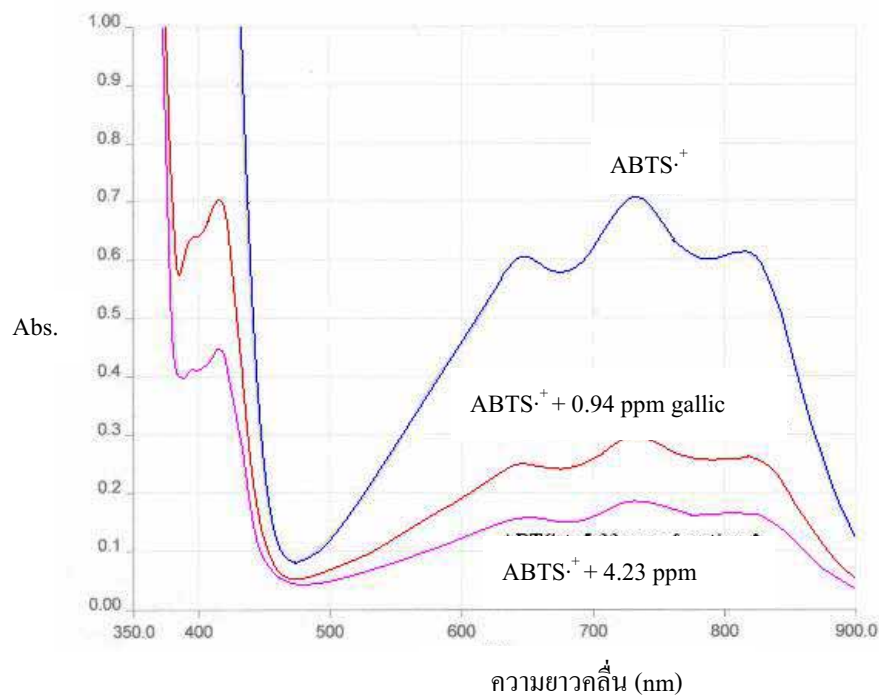
เจือจาง สารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ reagent ให้ได้ค่า Absorbance อยู่ในช่วง 0.70 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่นที่ 734 nm

3.4.2.2 การศึกษา spectrum และ kinetic behavior โดย ABTS assays

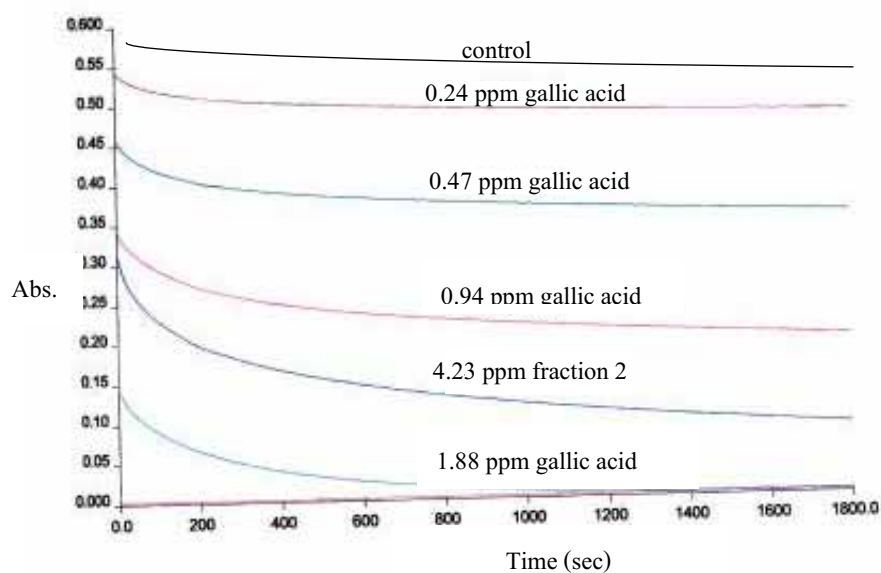
วิธีการทดลองทดลอง

บันทึก Spectrum (Abs. vs λ ในช่วงความยาวคลื่น 350-900 nm) ของสารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ reagent และ $ABTS^{+\bullet}$ reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เข้มข้น 0.94 ppm และสารสกัดผลพลพิกลูออน fraction2 เข้มข้น 4.23 ppm แสดงในรูปที่ 3.43 จากนั้นบันทึก absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm เทียบกับเวลาเพื่อศึกษา Kinetic curves ของ $ABTS^{+\bullet}$ reagent ผสมกับสารสกัดผลพิกลูออน fraction2 เข้มข้น 4.23 ppm ของพิกลูออน และ DPPH radical ผสมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่างๆโดยใช้ Blank เป็นน้ำ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.44 จากค่า absorbance คำนวณอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆแล้วนำอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Δ Abs/min) มาพลอตกับเวลา ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.50 และรูปที่ 3.45

ผลการทดลอง



รูปที่ 3.43 Spectrum ของ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reagent และ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดผลพลพิกลอ่อน fraction2



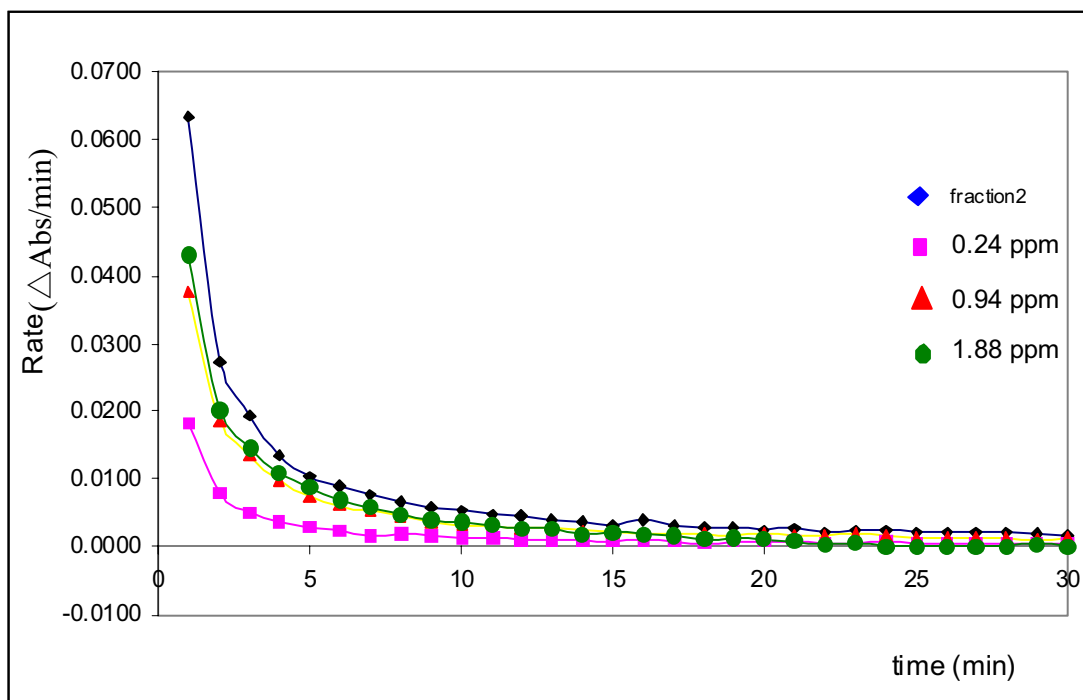
รูปที่ 3.44 Kinetic curve ของ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reagent และ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reagent + std. Gallic acid (Abs vs time)

ตารางที่ 3.50 ค่า absorbance และอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆของ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ + fraction2
เข้มข้น 4.23 ppm ของผลพิกุลอ่อน และ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ + สารละลายมาตรฐาน gallic acid

เวลา s	fraction2 เข้มข้น 4.2 ppm		gallic acid เข้มข้น 0.24 ppm		gallic acid เข้มข้น 0.94 ppm		gallic acid เข้มข้น 1.88 ppm	
	Abs.	rate	Abs.	rate	Abs.	rate	Abs.	rate
0	0.3138		0.5432		0.3452		0.1471	
1	0.2503	0.0635	0.5250	0.0182	0.3076	0.0376	0.1040	0.0431
2	0.2231	0.0272	0.5170	0.0080	0.2892	0.0184	0.0839	0.0201
3	0.2037	0.0194	0.5119	0.0051	0.2756	0.0136	0.0694	0.0145
4	0.1903	0.0134	0.5081	0.0038	0.2659	0.0097	0.0585	0.0109
5	0.1801	0.0102	0.5052	0.0029	0.2585	0.0074	0.0498	0.0087
6	0.1712	0.0089	0.5029	0.0023	0.2523	0.0062	0.0429	0.0069
7	0.1636	0.0076	0.5012	0.0017	0.2471	0.0052	0.0371	0.0058
8	0.1569	0.0067	0.4994	0.0018	0.2427	0.0044	0.0323	0.0048
9	0.1510	0.0059	0.4978	0.0016	0.2389	0.0038	0.0282	0.0041
10	0.1456	0.0054	0.4964	0.0014	0.2357	0.0032	0.0246	0.0036
11	0.1407	0.0049	0.4951	0.0013	0.2326	0.0031	0.0215	0.0031
12	0.1362	0.0045	0.4940	0.0011	0.2300	0.0026	0.0189	0.0026
13	0.1321	0.0041	0.4930	0.0010	0.2274	0.0026	0.0163	0.0026
14	0.1283	0.0038	0.4919	0.0011	0.2250	0.0024	0.0143	0.0020
15	0.1252	0.0031	0.4911	0.0008	0.2228	0.0022	0.0122	0.0021
16	0.1212	0.0040	0.4900	0.0011	0.2209	0.0019	0.0104	0.0018
17	0.1179	0.0033	0.4892	0.0008	0.2189	0.0020	0.0088	0.0016
18	0.1149	0.0030	0.4886	0.0006	0.2171	0.0018	0.0078	0.0010
19	0.1120	0.0029	0.4878	0.0008	0.2154	0.0017	0.0065	0.0013
20	0.1095	0.0025	0.4871	0.0007	0.2136	0.0018	0.0054	0.0011
21	0.1068	0.0027	0.4864	0.0007	0.2120	0.0016	0.0047	0.0007
22	0.1046	0.0022	0.4858	0.0006	0.2104	0.0016	0.0043	0.0004
23	0.1021	0.0025	0.4852	0.0006	0.2086	0.0018	0.0038	0.0005

ตารางที่ 3.50 ต่อ

24	0.0998	0.0023	0.4845	0.0007	0.2070	0.0016	0.0038	0.0000
25	0.0977	0.0021	0.4839	0.0006	0.2056	0.0014	0.0038	0.0000
26	0.0956	0.0021	0.4833	0.0006	0.2042	0.0014	0.0038	0.0000
27	0.0934	0.0022	0.4828	0.0005	0.2029	0.0013	0.0037	0.0001
28	0.0913	0.0021	0.4822	0.0006	0.2016	0.0013	0.0037	0.0000
29	0.0894	0.0019	0.4816	0.0006	0.2005	0.0011	0.0035	0.0002
30	0.0878	0.0016	0.4811	0.0005	0.1992	0.0013	0.0035	0.0000



รูปที่ 3.45 พล็อตระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับเวลาของ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ + fraction2 เข้มข้น 4.23 ppm ของพิกุลพลอ่อน และ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ + สารละลายมาตรฐาน gallic acid

พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของสารสกัดและสารมาตรฐานกับ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 นาที และมีค่าเกือบเท่ากันหลังจากเวลา 5 นาที และต่างกันน้อยมากหลังจาก 10 นาทีเป็นต้นไป จึงเลือกใช้เวลาที่ 10 นาที เพื่อการตรวจวัดปริมาณ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ที่เหลือหลังจากปฏิกิริยาได้

3.4.2.3 การศึกษา antioxidant activity ของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดจาก

ผลพิกุลโดย ABTS assay

วิธีการทดลอง

นำสารสกัดของผลพิกุลที่ปริมาตรต่างๆ ผสมกับสารละลาย ABTS⁺• reagent 2.90 mL และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water ให้ปริมาตรรวมสุดท้ายเป็น 3.00 mL หลังจากผสมเข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้ Blank เป็นน้ำ และ Control เป็นสารละลายผสม ABTS reagent 2.90 mL กับน้ำ 0.10 mL

3.4.2.3.1 การศึกษา antioxidant activity สารละลายมาตรฐาน gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 23.52, 47.03, 94.07, 188.14 และ 376.28 ppm ปีเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น 30 μ L ผสมกับสารละลาย ABTS⁺• reagent ปริมาตร 2.97 mL ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้ Blank เป็น deionized water และ Control เป็นสารละลายผสม ABTS reagent 2.97 mL กับน้ำ 30 mL

เมื่อนำไปวัดค่า Abs₇₃₄ จะสามารถคำนวณ % Remaining ABTS⁺• ตามสมการ 3.2

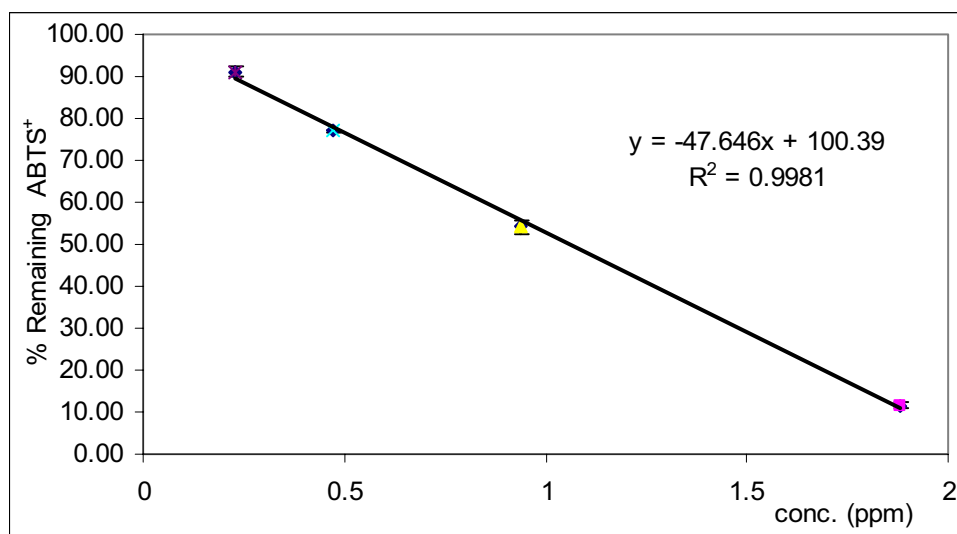
$$\% \text{ Remaining ABTS}^{+\bullet} = \frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{————— 3.2}$$

ผลการทดลอง

ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺• (%R) แสดงในตารางที่ 3.51 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining ABTS⁺• (%R) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid แสดงในรูป 3.46

ตารางที่ 3.51 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS^{•+} ของสารมาตรฐาน gallic acid โดย ABTS assay

Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ^{•+} (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
0.23	0.6203	91.46	0.5970	89.76	0.6025	90.06	0.6161	93.26	0.6043	91.37
0.47	0.5236	77.20	0.5088	76.50	0.5161	77.14	0.5092	77.08	0.5080	76.81
0.94	0.3633	53.57	0.3761	56.55	0.3624	54.17	0.3462	52.41	0.3561	53.84
1.88	0.0836	12.33	0.0680	10.22	0.0763	11.41	0.0811	12.28	0.0783	11.84
3.76	0.0026	0.38	0.0024	0.36	0.0021	0.31	0.0041	0.62	0.0035	0.53
Control	0.6782	-	0.6651	-	0.6690	-	0.6606	-	0.6614	-



รูปที่ 3.46 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

ค่า EC₅₀ เฉลี่ยจากการทดลองซ้ำทั้ง 5 ครั้ง เท่ากับ 1.06 ppm ซึ่งจะนำไปใช้เปรียบเทียบกับสารสกัดจากผลพิกุลเป็น gallic acid equivalent (GAE)

3.4.2.3.2 การศึกษา antioxidant activity ของ crude extract

ปริมาตรของสารสกัดจาก crude extract ในข้อ 3.1.2 ของพิถุระยะผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว ปริมาตรต่างๆกันที่ผสมกับสารละลาย ABTS⁺ reagent ปริมาตร 2.90 mL แสดงดังตารางที่ 3.52

ตารางที่ 3.52 ปริมาตร crude extract จากผลพิถุระยะผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก กับสารละลาย ABTS⁺ reagent

หลอดที่	ปริมาตรของ ABTS ⁺ reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μL)		
		ผลอ่อน (588.28 ppm)	ผลแก่จัด (588.24 ppm)	ผลสุก (1176.7 ppm)
1	2.90	5	10	10
2	2.90	10	20	20
3	2.90	15	30	30
4	2.90	20	40	40
5	2.90	25	50	50
Control	2.90	-	-	-

ผลการทดลอง

ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺ แสดงในตารางที่ 3.53 – 3.55 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดแสดงในรูป 3.47 – 3.49

ตารางที่ 3.53 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺ จาก crude extract ของผลพิถุระยะผลอ่อน ครั้งที่ 1 – 5 โดยวิธี ABTS assay

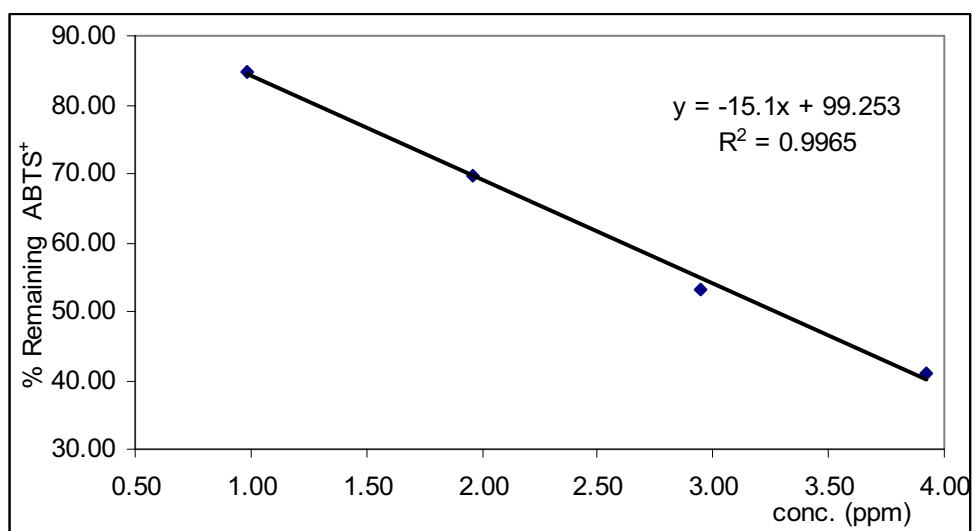
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ^{•+} (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
0.98	0.5308	85.81	0.5233	87.17	0.5260	84.89	0.5393	83.83	0.5491	84.59
1.961	0.4574	73.94	0.4202	70.00	0.4325	69.80	0.4322	67.18	0.4324	66.62
2.942	0.3171	51.26	0.3474	57.87	0.3297	53.21	0.3339	51.90	0.3583	55.20
3.922	0.2512	40.61	0.2565	42.73	0.2544	41.06	0.2695	41.89	0.2596	39.99
4.903	0.2424	39.19	0.2425	40.40	0.2340	37.77	0.2252	35.01	0.2252	34.69
Control	0.6186	-	0.6003	-	0.6196	-	0.6433	-	0.6491	-

ตารางที่ 3.54 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS^{•+} จาก crude extract ของผลพืกลูกแกะจัด ครั้งที่ 1 – 5 โดยวิธี ABTS assay

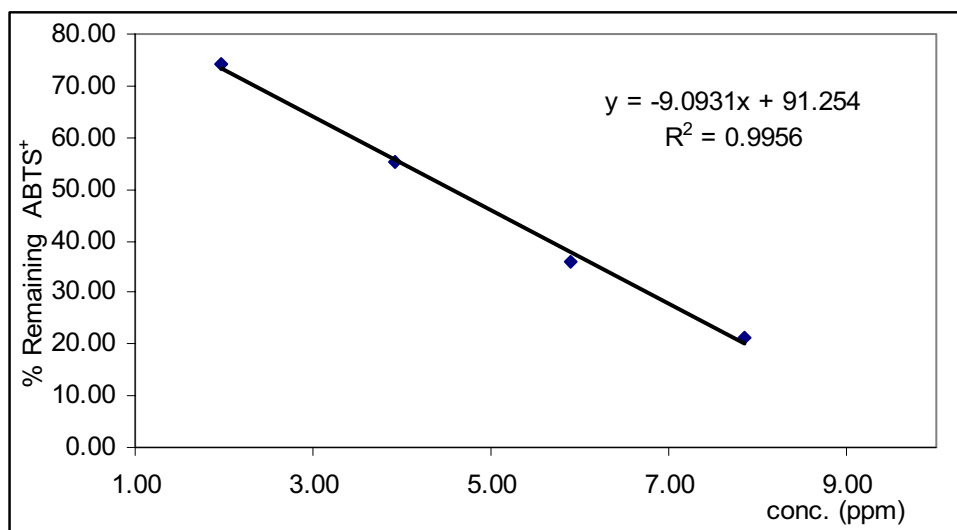
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ^{•+} (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
1.961	0.4477	69.62	0.4833	75.78	0.4771	74.33	0.5008	78.21	0.5001	77.98
3.922	0.3498	54.39	0.3519	55.17	0.3545	55.23	0.3523	55.02	0.3502	54.61
5.882	0.2336	36.32	0.2379	37.30	0.2296	35.77	0.2346	36.64	0.2304	35.93
7.843	0.0995	15.47	0.1409	22.09	0.1373	21.39	0.1304	20.37	0.1298	20.24
9.804	0.0995	15.47	0.1073	16.82	0.1069	16.65	0.1035	16.16	0.102	15.91
Control	0.6431	-	0.6378	-	0.6419	-	0.6403	-	0.6413	-

ตารางที่ 3.55 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS^{•+} จาก crude extract ของผลพืกลูกสุก ครั้งที่ 1 – 5 โดยวิธี ABTS assay

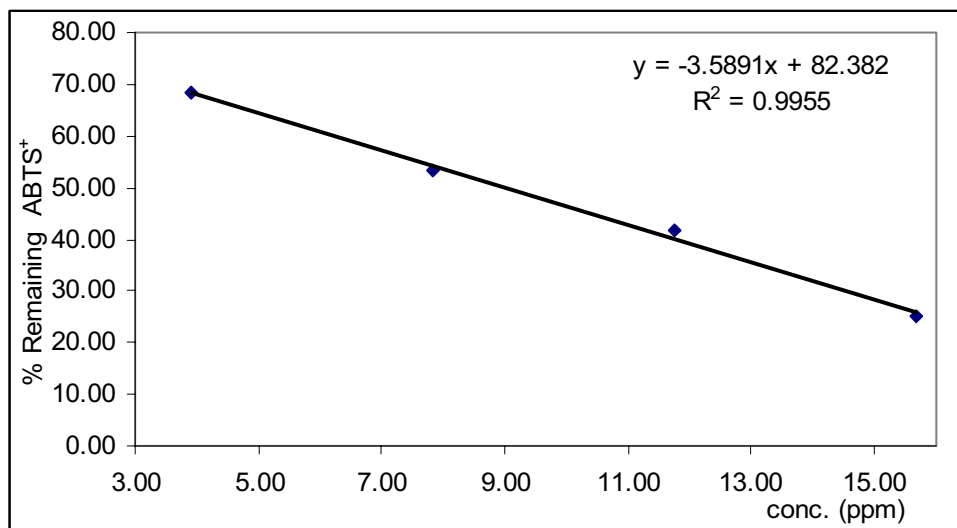
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ^{•+} (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
3.923	0.4920	76.79	0.4520	71.58	0.4356	68.33	0.4420	70.23	0.4391	69.62
7.845	0.3629	56.64	0.3694	58.50	0.3399	53.32	0.3462	55.00	0.3502	55.53
11.768	0.2862	44.67	0.2642	41.84	0.2669	41.87	0.2707	43.01	0.2664	42.24
15.690	0.1745	27.24	0.1624	25.72	0.1608	25.22	0.1529	24.29	0.1631	25.86
19.613	0.1346	21.01	0.1220	19.32	0.1920	30.12	0.1303	20.70	0.1212	19.22
Control	0.6407	-	0.6315	-	0.6375	-	0.6294	-	0.6307	-



รูปที่ 3.47 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก crude extract ของผลพิกุลอ่อน



รูปที่ 3.48 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก crude extract ของผลพื้กุลแก่จัด



รูปที่ 3.49 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก crude extract ของผลพื้กุลสุก

ค่า EC_{50} ของ crude extract จากผลพิกุล ผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุกแสดงดังตารางที่ 3.56
 ตารางที่ 3.56 ค่า EC_{50} ของ crude extract จากผลพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก โดย ABTS assay

ครั้งที่	EC_{50} (ppm)		
	ผลอ่อน	ผลแก่จัด	ผลสุก
1	3.52	4.24	10.13
2	3.42	4.63	9.65
3	3.26	4.54	9.02
4	3.23	4.65	9.32
5	3.23	4.61	9.35

จากค่า EC_{50} คำนวณ antioxidant activity โดยการเทียบกับค่า EC_{50} ที่ได้จากสารละลาย
 มาตรฐาน gallic acid รายงาน antioxidant activity เป็น gallic acid equivalent (GAE)
 ค่า GAE ที่คำนวณได้แต่ละระยะแสดงดังตารางที่ 3.57

ตารางที่ 3.57 ค่า GAE ของ crude extract จากผลพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัดและผลสุก โดย ABTS assay
 (n = 5)

ครั้งที่	GAE (mg/g sample)		
	ผลอ่อน	ผลแก่จัด	ผลสุก
1	301.14	250.06	104.64
2	309.94	228.94	109.84
3	325.15	233.48	117.52
4	328.17	227.96	113.73
5	328.17	229.93	113.68
เฉลี่ย $\pm$ SD	318.51 $\pm$ 12.31	234.07 $\pm$ 9.18	111.88 $\pm$ 4.87

จากค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิกุลแต่ละระยะพบว่าค่า GAE ของ ผลอ่อน > ผลแก่จัด > ผลสุก ซึ่งค่า GAE แสดงถึงปริมาณ antioxidant capacity นั้นแสดงว่าสารสกัดจากผลพิกุลระยะ ผลอ่อนมี antioxidant capacity มากกว่าผลแก่จัดและผลสุกตามลำดับ

3.4.2.3.3 การศึกษา antioxidant activity ของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลอ่อน

fraction 1, 2 และ 3

ใช้ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่าง ๆ กันที่ ผสมกับสารละลาย ABTS⁺• reagent ปริมาตร 2.90 mL แสดงดังตารางที่ 3.58

ตารางที่ 3.58 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย ABTS⁺• reagent

หลอดที่	ปริมาตรของ ABTS ⁺ • reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μL)		
		F1 (10910 ppm)	F2 (423.52 ppm)	F3 (705.6 ppm)
1	2.90	10	10	20
2	2.90	20	30	40
3	2.90	30	50	60
4	2.90	40	70	80
5	2.90	50	90	100
Control	2.90	-	-	-

ผลการทดลอง

ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺• แสดงในตารางที่ 3.59 – 3.61 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining ABTS⁺• (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากแสดงในรูป 3.50 – 3.52

ตารางที่ 3.59 ค่า Absorbance และ % Remaining $ABTS^{+\bullet}$ (%R) ของพิกุลผลอ่อน fraction 1 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay

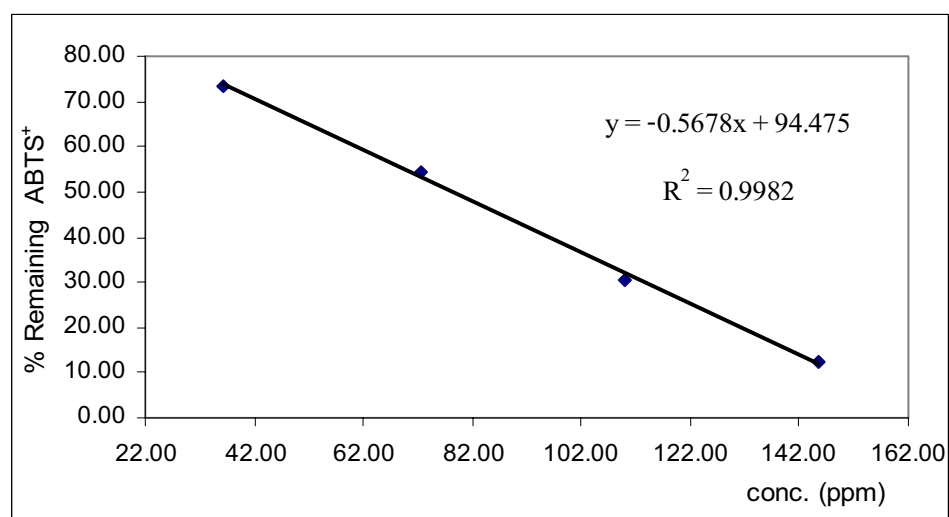
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining $ABTS^{+\bullet}$ (%R)					
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
36.40	0.4939	74.82	0.4826	72.94	0.4793	73.57
72.70	0.3662	55.48	0.3565	53.88	0.3536	54.27
109.90	0.1977	29.95	0.1979	29.91	0.1994	30.61
145.50	0.0808	12.24	0.0763	11.53	0.0814	12.49
181.80	0.0287	4.35	0.0204	3.08	0.0303	4.65
Control	0.6601	-	0.6616	-	0.6515	-

ตารางที่ 3.60 ค่า Absorbance และ % Remaining $ABTS^{+\bullet}$ (%R) ของพิกุลผลอ่อน fraction 2 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay

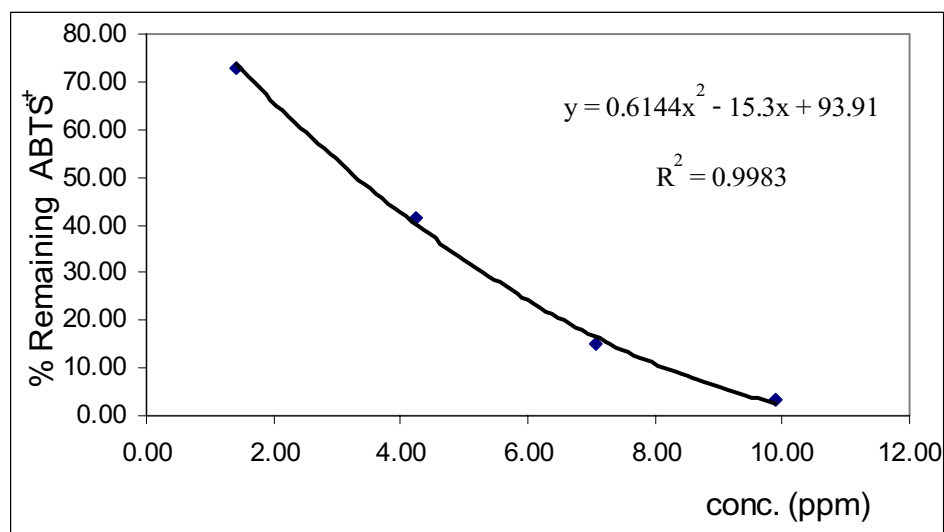
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining $ABTS^{+\bullet}$ (%R)					
	ครั้งที่1		ครั้งที่2		ครั้งที่3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
1.41	0.4676	73.06	0.4536	70.52	0.4804	73.51
4.23	0.2667	41.67	0.2593	40.31	0.2671	40.87
7.06	0.0962	15.03	0.0837	13.01	0.0906	13.86
9.88	0.0206	3.22	0.0232	3.61	0.0223	3.41
12.71	0.0059	0.92	0.0062	0.96	0.0057	0.87
Control	0.6400	-	0.6432	-	0.6535	-

ตารางที่ 3.61 ค่า Absorbance และ % Remaining $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (%R) ของพิกุลผลอ่อน fraction 3 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay

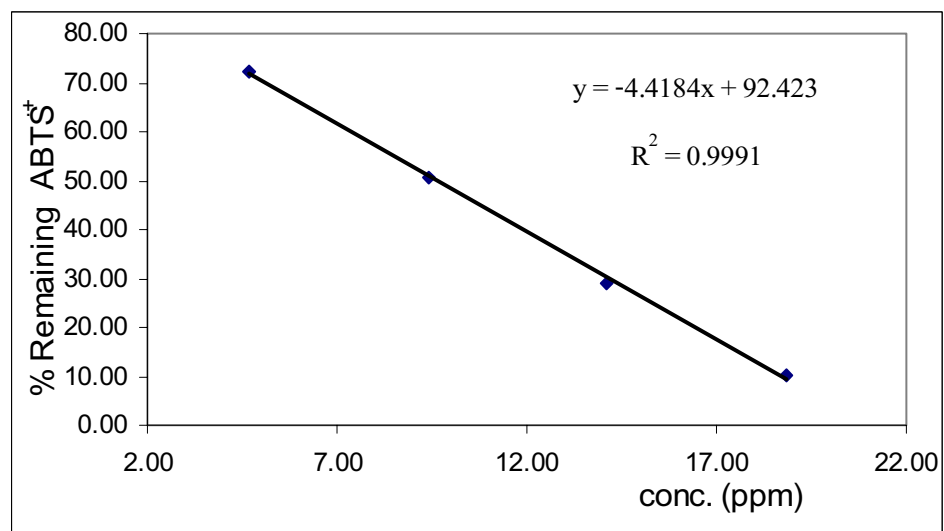
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
4.70	0.4795	72.16	0.4803	72.08	0.6548	
9.41	0.3364	50.62	0.3410	51.18	0.4767	72.80
14.11	0.1928	29.01	0.1893	28.41	0.3404	51.99
18.82	0.0668	10.05	0.0769	11.54	0.1904	29.08
23.52	0.0313	4.71	0.0302	4.53	0.0646	9.87
Control	0.6645	-	0.6663	-	0.6548	-



รูปที่ 3.50 พล็อตระหว่าง % Remaining $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากพิกุลผลอ่อน fraction 1



รูปที่ 3.51 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากพิกุลผล
อ่อน fraction 2



รูปที่ 3.52 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากพิกุลผล
อ่อน fraction 3

ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 แสดงดังตารางที่ 3.62

ตารางที่ 3.62 ค่า EC_{50} ของสารสกัดพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดย ABTS assay

ครั้งที่	EC_{50} (ppm)		
	F1	F2	F3
1	79.37	3.57	9.6
2	77.24	3.78	9.64
3	78.33	3.55	9.74

จากค่า EC_{50} คำนวณ antioxidant activity โดยการเทียบกับค่า EC_{50} ที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid รายงาน antioxidant activity เป็น gallic acid equivalent (GAE) ค่า GAE ที่คำนวณได้แสดงดังตารางที่ 3.63

ตารางที่ 3.63 ค่า GAE ของสารสกัดพิกุลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

ครั้งที่	GAE (mg/g fraction)		
	F1	F2	F3
1	13.35	296.92	110.42
2	13.72	280.42	109.96
3	13.53	298.59	108.83
เฉลี่ย $\pm$ SD	13.53 $\pm$ 0.18	291.98 $\pm$ 10.04	109.74 $\pm$ 0.82

จากค่า GAE ของสารสกัดจากพิกุลผลอ่อนแต่ละ fraction พบว่าค่า GAE ของ F2 > F3 > F1 ซึ่งค่า GAE แสดงถึงปริมาณ antioxidant activity นั้นแสดงว่าสารสกัดจากพิกุลผลอ่อน F2 มี antioxidant activity มากกว่า F3 และ F1 ตามลำดับ

3.4.2.3.4 การศึกษา antioxidant activity ของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลแก่จัด fraction

1, 2 และ 3

ใช้ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่าง ๆ กันที่ผสมกับสารละลาย ABTS⁺ reagent ปริมาตร 2.90 mL แสดงดังตารางที่ 3.64

ตารางที่ 3.64 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิกุลระยะผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย ABTS⁺ reagent

หลอดที่	ปริมาตรของ ABTS ⁺ reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μL)		
		F1 (3550 ppm)	F2 (327.2 ppm)	F3 (957.2 ppm)
1	2.90	10	10	10
2	2.90	20	20	20
3	2.90	30	30	30
4	2.90	40	40	40
5	2.90	50	50	50
Control	2.90	-	-	-

ผลการทดลอง

ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺ แสดงในตารางที่ 3.65 – 3.67 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดแสดงในรูป 3.53 – 3.55

ตารางที่ 3.65 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺• (%R) ของผลพิกุลแก่จัด fraction 1 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay

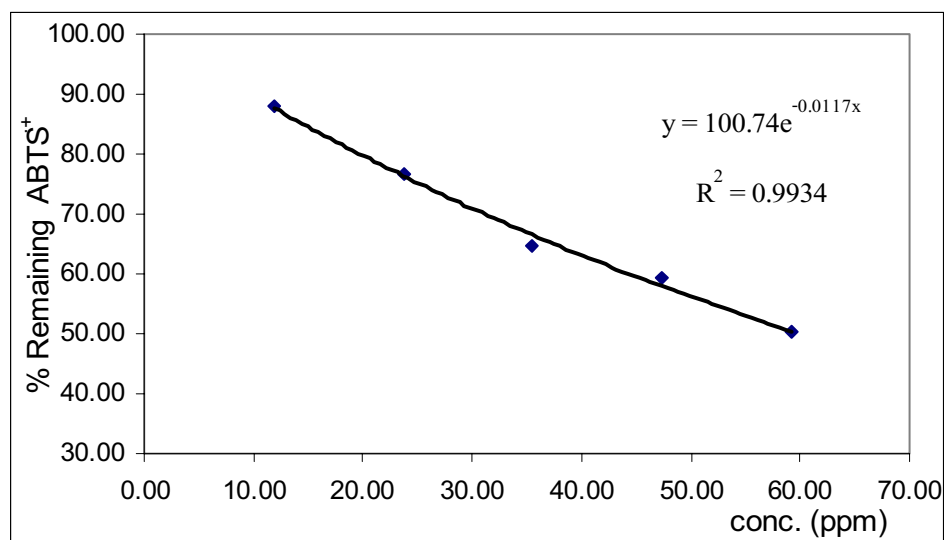
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
11.83	0.6086	89.04	0.5987	88.10	0.5929	87.17
23.67	0.5302	77.57	0.5213	76.71	0.5313	78.11
35.50	0.4472	65.43	0.4402	64.77	0.4502	66.19
47.33	0.4089	59.82	0.4026	59.24	0.4107	60.38
59.17	0.3587	52.48	0.3410	50.18	0.3526	51.84
Control	0.6835	-	0.6796	-	0.6802	-

ตารางที่ 3.66 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺• (%R) ของผลพิกุลแก่จัด fraction 2 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay

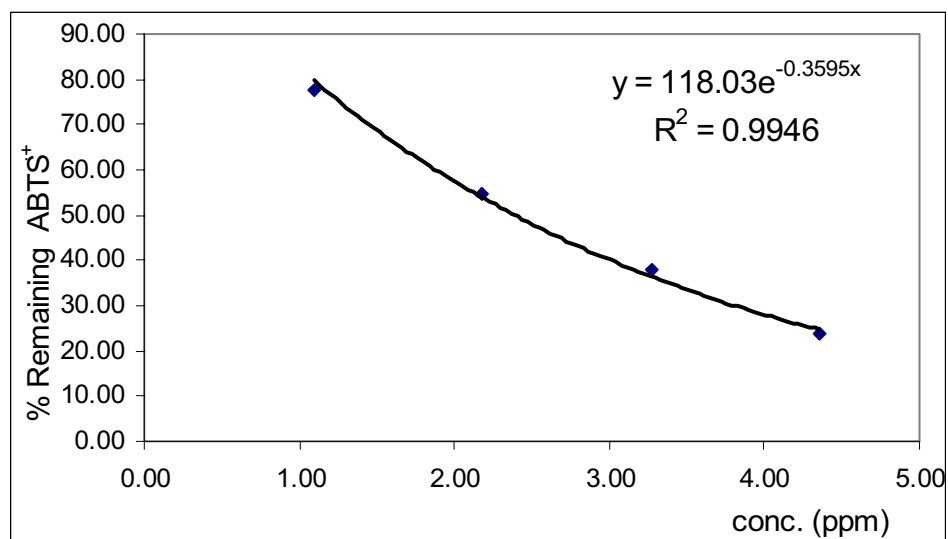
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
1.09	0.5188	77.78	0.5262	80.18	0.5060	77.50
2.18	0.3650	54.72	0.3670	55.92	0.3579	54.82
3.27	0.2542	38.11	0.2606	39.71	0.2537	38.86
4.36	0.1585	23.76	0.1485	22.63	0.1505	23.05
5.45	0.1311	19.66	0.1212	18.47	0.1326	20.31
Control	0.6670	-	0.6563	-	0.6529	-

ตารางที่ 3.67 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺• (%R) ของผลพิกุลแก่จัด fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย ABTS assay

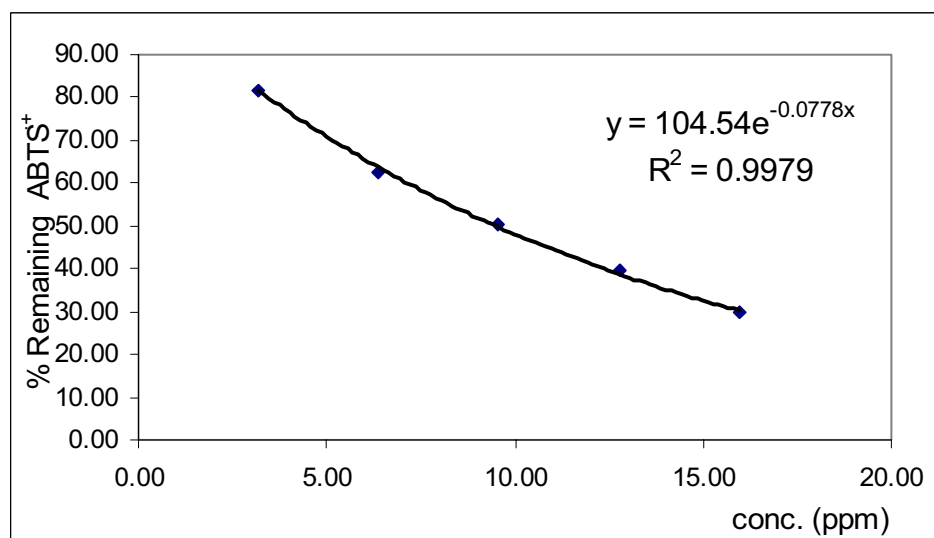
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
3.19	0.5461	82.37	0.5512	81.95	0.5471	81.61
6.38	0.4368	65.88	0.4265	63.41	0.4201	62.66
9.57	0.3493	52.68	0.3399	50.54	0.3367	50.22
12.76	0.2701	40.74	0.2676	39.79	0.2661	39.69
15.95	0.1959	29.55	0.1898	28.22	0.1989	29.67
Control	0.6630	-	0.6726	-	0.6704	-



รูปที่ 3.53 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺• (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction 1



รูปที่ 3.54 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิทูลแก่
จัด fraction 2



รูปที่ 3.55 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลพิทูลแก่
จัด fraction 3

ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากผลพืกลูกพลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 แสดงดังตารางที่ 3.68

ตารางที่ 3.68 ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพืกลูกพลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี ABTS assay

ครั้งที่	EC_{50} (ppm)		
	F1	F2	F3
1	62.86	2.39	9.81
2	59.87	2.43	9.42
3	62.77	2.38	9.48

จากค่า EC_{50} คำนวณ antioxidant activity โดยการเทียบกับค่า EC_{50} ที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid รายงาน antioxidant activity เป็น gallic acid equivalent (GAE) ค่า GAE ที่คำนวณได้แสดงดังตารางที่ 3.69

ตารางที่ 3.69 ค่า GAE ของสารสกัดผลพืกลูกพลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดย ABTS assay (n = 3)

ครั้งที่	GAE (mg/g fraction)		
	F1	F2	F3
1	16.86	443.51	108.05
2	17.70	436.21	112.53
3	16.89	445.38	111.81
เฉลี่ย $\pm$ SD	17.15 ± 0.48	441.70 ± 4.85	110.80 ± 2.40

จากค่า GAE ของสารสกัดจากผลพืกลูกพลแก่จัดแต่ละ fraction พบว่าค่า GAE ของ F2 > F3 > F1 ซึ่งค่า GAE แสดงถึงปริมาณ antioxidant activity นั้นแสดงว่าสารสกัดจากผลพืกลูกพลแก่จัด F2 มี antioxidant activity มากกว่า F3 และ F1 ตามลำดับ

3.4.2.3.5 การศึกษา antioxidant capacity ของสารสกัดจากผลพืกระยะผลสุก fraction 1, 2

และ 3

ใช้ปริมาตรของสารสกัดจากผลพืกระยะผลสุก fraction 1, 2 และ 3 ปริมาตรต่าง ๆ กันที่ผสมกับสารละลาย ABTS⁺• reagent ปริมาตร 2.90 mL แสดงดังตารางที่ 3.70

ตารางที่ 3.70 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพืกระยะผลสุก fraction 1, 2 และ 3 กับสารละลาย ABTS⁺• reagent

หลอดที่	ปริมาตรของ ABTS ⁺ • reagent (mL)	ปริมาตรสารสกัด (μL)		
		F1 (293 ppm)	F2 (193.56 ppm)	F3 (1070.2 ppm)
1	2.90	10	40	10
2	2.90	20	50	20
3	2.90	30	60	30
4	2.90	40	70	40
5	2.90	50	80	50
Control	2.90	-	-	-

ผลการทดลอง

ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS^{•+} แสดงในตารางที่ 3.71 – 3.73 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining ABTS^{•+} (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากแสดงในรูป 3.56 – 3.58

ตารางที่ 3.71 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS^{•+} (%R) ของพิกุลผลสุก fraction 1 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay

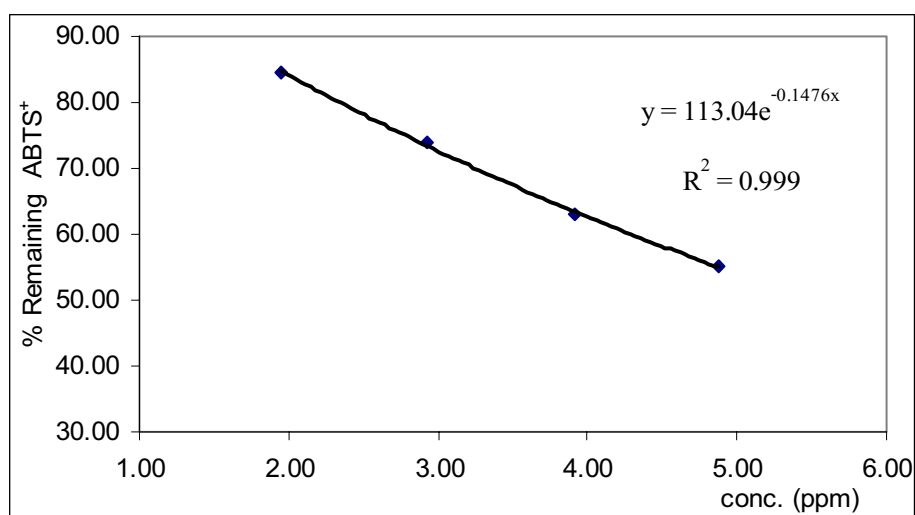
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ^{•+} (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
0.98	0.5891	90.13	0.5862	89.96	0.6010	91.01
1.95	0.5465	83.61	0.5511	84.58	0.5562	84.22
2.93	0.4862	74.39	0.4813	73.86	0.4901	74.21
3.91	0.4068	62.24	0.4107	63.03	0.4262	64.54
4.88	0.3601	55.09	0.3593	55.14	0.3565	53.98
Control	0.6536	-	0.6516	-	0.6604	-

ตารางที่ 3.72 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS^{•+} (%R) ของพิกุลผลสุก fraction 2 ครั้งที่ 1 – 3 โดย ABTS assay

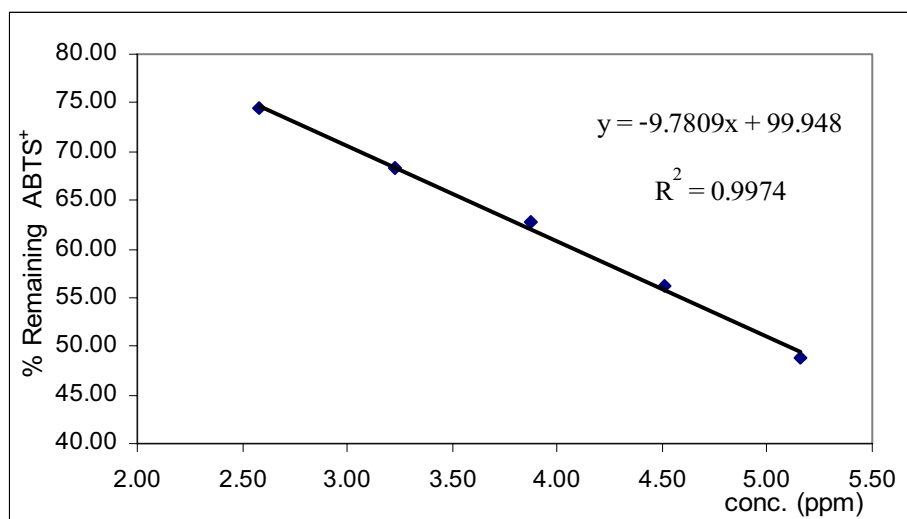
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ^{•+} (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
2.58	0.4903	74.38	0.4919	74.40	0.5060	76.97
3.23	0.4498	68.23	0.4506	68.15	0.4412	67.11
3.87	0.4139	62.79	0.406	61.40	0.4106	62.46
4.51	0.3702	56.16	0.3693	55.85	0.3812	57.99
5.16	0.3225	48.92	0.3112	47.07	0.2929	44.55
Control	0.6592	-	0.6612	-	0.6574	-

ตารางที่ 3.73 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS⁺• (%R) ของพิกุลผลสุก fraction 3 ครั้งที่ 1 – 5 โดย ABTS assay

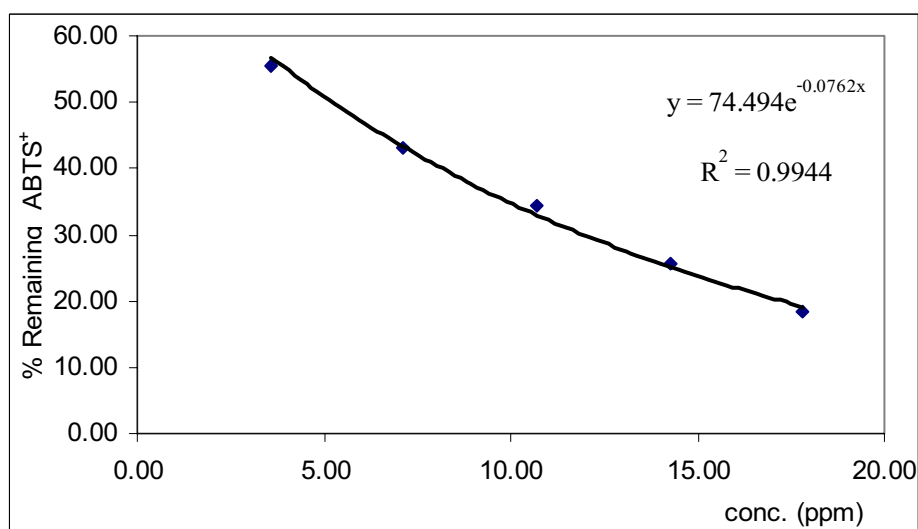
Conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS ⁺ • (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
3.57	0.3528	54.29	0.3518	53.91	0.3602	55.33
7.13	0.2769	42.61	0.2669	40.90	0.2814	43.23
10.70	0.2221	34.18	0.2198	33.68	0.2235	34.33
14.27	0.1632	25.12	0.1535	23.52	0.1671	25.67
17.83	0.1182	18.19	0.1030	15.78	0.1201	18.45
Control	0.6498	-	0.6526	-	0.6510	-



รูปที่ 3.56 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺• (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากพิกุลผลสุก fraction 1



รูปที่ 3.57 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากพิกุลผลสุก fraction 2



รูปที่ 3.58 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS⁺ (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากพิกุลผลสุก fraction 3

ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากพิกุลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 แสดงดังตารางที่ 3.74

ตารางที่ 3.74 ค่า EC_{50} ของสารสกัดพิกุลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดย ABTS assay

ครั้งที่	EC_{50} (ppm)		
	F1	F2	F3
1	62.86	2.39	9.81
2	59.87	2.43	9.42
3	62.77	2.38	9.48

จากค่า EC_{50} คำนวณ antioxidant activity โดยการเทียบกับค่า EC_{50} ที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid รายงาน antioxidant activity เป็น gallic acid equivalent (GAE) ค่า GAE ที่คำนวณได้แสดงดังตารางที่ 3.75

ตารางที่ 3.75 ค่า GAE ของสารสกัดพิกุลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

ครั้งที่	GAE (mg/g fraction)		
	F1	F2	F3
1	191.68	207.44	210.74
2	191.68	213.71	214.14
3	193.43	216.32	202.67
เฉลี่ย $\pm$ SD	192.26 $\pm$ 1.01	212.49 $\pm$ 4.56	209.18 $\pm$ 5.89

จากค่า GAE ของสารสกัดจากพิกุลผลสุกแต่ละ fraction พบว่าค่า GAE ของแต่ละ fraction มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อใช้การคำนวณทางสถิติคือ t-test เพื่อดูแนวโน้มของค่าที่วิเคราะห์ได้พบว่าค่า GAE ของ F2 $\approx$ F3 > F1 ซึ่งค่า GAE แสดงถึงปริมาณ antioxidant capacity นั้นแสดงว่าสารสกัดจากพิกุลระยะ ผลสุก F2 และ F3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมี antioxidant capacity มากกว่า F1

3.5 ศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัดจากพิกุลด้วยเทคนิค

Folin-Denis assay

3.5.1 การเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลาย Folin – Denis reagent

ชั่ง Sodium tungstate 10 mg ละลายใน deionized water 75 mL ใน flask 250 ml เติม phosphomolybdic acid 2 g แล้วนำไป reflux 2 ชั่วโมง พร้อมกับให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย deionized water เก็บรักษาไว้ในที่มืด

2. สารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 100 ppm

ชั่งสารมาตรฐาน 0.01 g ละลายใน methanol ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ในขวดปริมาตร

3. สารละลายอิมิตัวของ NaHCO_3

ละลาย NaHCO_3 ใน deionized water จนกระทั่ง NaHCO_3 ไม่ละลาย กรองด้วยกระดาษกรอง ได้สารละลายอิมิตัวของ NaHCO_3

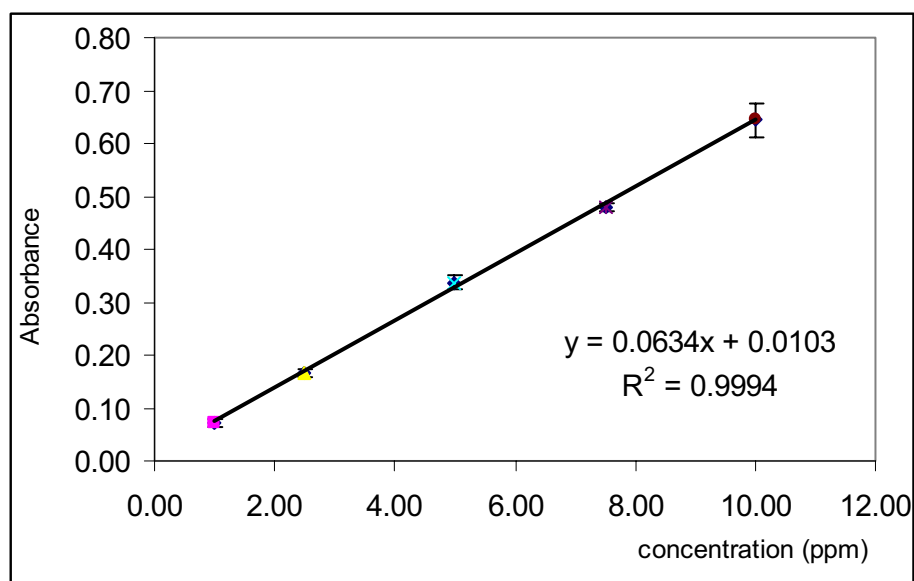
3.5.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัดผลพิกุล โดยเปรียบเทียบเป็นปริมาณสารมาตรฐาน Gallic acid ซึ่งจะแสดงออกมาในรูปของ GAE

วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 100 ppm ปริมาตรต่างๆผสมกับสารละลาย Folin – Denis 0.8 mL และ สารละลายอิมิตัว NaHCO_3 0.8 mL ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL ด้วย deionized water หลังผสมเข้ากัน 10 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ 700 nm ค่า absorbance ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 3.76 เขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid เพื่อใช้เทียบสำหรับหาค่า GAE แสดงดังรูปที่ 3.59

ตารางที่ 3.76 ค่า absorbance ที่ 700 nm ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

หลอดที่	ปริมาตร GA (μL)	ความเข้มข้น GA (ppm)	Absorbance				
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5
1	100	1.00	0.0623	0.0636	0.0760	0.0845	0.0729
2	250	2.50	0.1608	0.1790	0.1576	0.1662	0.1673
3	500	5.00	0.3296	0.3501	0.3198	0.3355	0.3482
4	750	7.50	0.4757	0.4849	0.4716	0.4817	0.4893
5	1000	10.00	0.6111	0.6568	0.6113	0.6535	0.6861



รูปที่ 3.59 calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยเทคนิค Folin-Denis Assay

ทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid กับสารสกัดจากผลพิบูล โดยใช้สารสกัดผลพิบูลที่เตรียมจากข้อ 3.1.3 ซึ่งสารสกัดจากระยะผลอ่อน fraction 1 เข้มข้น 10910 ppm fraction 2 เข้มข้น 423.5 ppm และ fraction 3 เข้มข้น 705.6 ppm ผลแก่จัด fraction 1 เข้มข้น 3550 ppm fraction 2 เข้มข้น 327.2 ppm และ fraction 3 เข้มข้น 951.2 ppm ส่วนผลสุก fraction 1 เข้มข้น 2930 ppm fraction 2 เข้มข้น 3871.2 ppm และ fraction 3 เข้มข้น 2140.4 ppm ปริมาตรสารสกัดที่ใช้แสดงดังตาราง 3.77 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่า GAE (mg/g fraction) ของสารตัวอย่างได้ผลในตารางที่ 3.78 – 3.80

ตารางที่ 3.77 ปริมาตรของสารสกัดจากผลพิบูล

Fraction	ปริมาตรสารสกัด (μL)		
	ผลอ่อน	ผลแก่จัด	ผลสุก
1	500	750	50
2	100	250	50
3	100	250	50

ตารางที่ 3.78 ค่า GAE ของสารสกัดผลพิบูลผลอ่อน fraction 1, 2 และ 3 โดย Folin-Denis Assay

ครั้งที่	F1		F2		F3	
	Abs.	GAE	Abs.	GAE	Abs.	GAE
1	0.4061	19.10	0.2576	371.47	0.3893	169.76
2	0.4219	19.55	0.2532	364.97	0.3901	170.12
3	0.4306	20.27	0.2493	359.21	0.3790	165.20
4	0.4517	21.28	0.2423	348.88	0.3926	171.22
5	0.4339	20.43	0.2533	365.12	0.3843	167.75

ตารางที่ 3.79 ค่า GAE ของสารสกัดผลพิกุลผลแก่จัด fraction 1, 2 และ 3 โดย Folin-Denis Assay

ครั้งที่	F1		F2		F3	
	Abs.	GAE	Abs.	GAE	Abs.	GAE
1	0.5461	31.70	0.2634	491.67	0.4765	307.21
2	0.5626	32.66	0.2776	518.79	0.4715	303.95
3	0.5432	31.52	0.2818	526.82	0.4860	313.41
4	0.5464	31.71	0.2778	519.18	0.4873	314.26
5	0.5464	30.90	0.3034	528.08	0.4896	315.76

ตารางที่ 3.80 ค่า GAE ของสารสกัดผลพิกุลผลสุก fraction 1, 2 และ 3 โดย Folin-Denis Assay

ครั้งที่	F1		F2		F3	
	Abs.	GAE	Abs.	GAE	Abs.	GAE
1	0.2080	215.44	0.3257	258.07	0.2056	291.27
2	0.2156	223.55	0.3505	278.09	0.2168	307.62
3	0.2054	212.67	0.3795	301.50	0.2043	289.38
4	0.2350	244.24	0.3814	303.04	0.2141	303.68
5	0.2047	211.92	0.3530	280.11	0.2120	300.61

จากค่า GAE (mg/g fraction) ของสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสามระยะพบว่าในพิกุลผลอ่อน และ ผลแก่จัดค่า GAE ของสารสกัด $F2 > F3 > F1$ นั้นแสดงว่าสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัด ผลพิกุลในสารสกัดจากพิกุลผลอ่อนและผลแก่จัด F2 มากกว่า F1 และ F3 ตามลำดับ ส่วนในพิกุลผล สุกนั้นพบว่าค่า GAE ของสารสกัด F2 และ F3 มากกว่า F1 นั้นแสดงว่าปริมาณสารประกอบฟีนอล รวมทั้งหมดในสารสกัดผลพิกุลในสารสกัดจากพิกุลผลสุก F2 และ F3 ไม่แตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญและมีค่ามากกว่า F1

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลจากผลพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัดและ ผลสุก

antioxidant จากผลพิกุลถูกสกัดในรูป crude extract และสารประกอบฟีนอลที่สกัดแยกออกจากผลพิกุลดัดแปลงจากวิธีของ Krygier, K. [21] ได้เป็น fraction ต่างๆคือ free phenolic acids fraction (F1) soluble phenolic acid esters fraction (F2) และ insoluble-bound phenolic acids fraction (F3) ได้ % yield และความเข้มข้น ตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 % yield และความเข้มข้น ของสารสกัดจากผลพิกุลระยะต่างๆ

สารสกัด	% yield	ความเข้มข้น (mg/mL)
ผลอ่อน	-	58.83
ผลแก่จัด	-	58.82
ผลสุก	-	58.84
ผลอ่อน		
F1	0.364	10.91
F2	3.527	42.35
F3	0.588	7.06
ผลแก่จัด		
F1	0.118	3.55
F2	2.726	32.72
F3	0.797	9.57
ผลสุก		
F1	0.098	2.93
F2	1.613	19.36
F3	8.290	107.02

พบว่าน้ำหนักและ %yield ของสารสกัดจากผลพิกุลระยะต่างๆมีความแตกต่างกันตามระยะของผลพิกุลโดยพบว่าพิกุลระยะผลอ่อนและผลแก่จัดสารสกัดจาก fraction2 มีปริมาณมากที่สุด แสดงว่าในพิกุลระยะผลอ่อนและผลแก่จัดสารประกอบฟีนอลในผลพิกุลทั้งสองระยะนี้ส่วนใหญ่อยู่ในรูป soluble phenolic acid esters ส่วนในพิกุลระยะผลสุกสารสกัดจาก fraction3 มีปริมาณมากที่สุดแสดงว่าในพิกุลระยะผลสุกสารประกอบฟีนอลส่วนใหญ่อยู่ในรูป insoluble-bound phenolic acids

4.2 การศึกษาสารประกอบฟีนอล ในสารสกัดจากผลพิกุลด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) และการวิเคราะห์ antioxidant ในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC

การใช้เทคนิค TLC ศึกษา antioxidant ในสารสกัดจากผลพิกุลเป็นการวิเคราะห์หองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากผลพิกุลใช้ stationary phase เป็น silica gel และใช้ mobile phase เป็น ethyl acetate/methanol/water อัตราส่วน 10:2:1 หลังจาก spray ด้วย 2% FeCl_3 ใน ethanol แล้วนำไปอบที่ 105°C เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว พบว่าบนแผ่น TLC ที่ spot ด้วยสกัดจากพิกุลผลอ่อน fraction1 จะเห็นเป็นสีน้ำเงินเพียงจุดเดียว แสดงว่าในสารสกัดจาก fraction1 มีสารประกอบฟีนอลชนิด trihydroxyl เป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว ใน fraction 2 จะเห็นเป็นสีน้ำเงิน สีเขียวและสีน้ำตาล แสดงว่าใน fraction 2 มีสารประกอบฟีนอลชนิด trihydroxyl dihydroxyl และสารประกอบฟีนอลชนิดอื่นๆเป็นองค์ประกอบ ส่วนใน fraction3 จะเห็นเป็นสีน้ำเงินและสีเขียว แสดงว่าใน fraction 3 มีสารประกอบฟีนอลชนิด trihydroxyl และ dihydroxyl เป็นองค์ประกอบ

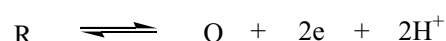
ผลการเปรียบเทียบค่า R_f ของสารสกัดจากผลพิกุลกับสารมาตรฐานพบว่าจากค่า R_f ของสารสกัด fraction1 มีค่า R_f ค่าเดียวคือ 0.76 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า R_f ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid แสดงว่าใน fraction1 มี gallic acid เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใน fraction2 และ fraction3 มีค่า R_f สามค่าคือ 0.76 0.83 และ 0.87 ซึ่งใกล้เคียงกับ R_f ของ gallic acid และ catechin แสดงว่าในสารสกัดจาก fraction2 และ fraction3 มี gallic acid และ catechin เป็นองค์ประกอบ

จากโครมาโทแกรมของ HPLC พบว่าในสารสกัดจากผลพิกุลอ่อนทั้งสาม fractions มีสาร antioxidant หลายตัวเป็นองค์ประกอบโดยมี gallic acid เป็นองค์ประกอบหลักโดยดูจากความสูงของพีค ดังนั้นในการหา antioxidant activity จึงหาเป็นปริมาณ gallic acid ซึ่งพบว่าสารสกัดจากผลพิกุลอ่อน fraction 1 และ fraction 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าน้อยกว่า fraction 2 ซึ่งให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับเทคนิค DPV DPPH assay ABTS assay และ Folin-Denis assay ที่เป็นเช่นนั้นอาจเนื่องมาจากเทคนิค HPLC เป็นการหาปริมาณ gallic acid ในตัวอย่างเพียงตัวเดียวในขณะที่เทคนิคอื่นๆเป็นการหาปริมาณ antioxidant ในรูปแบบรวม

4.3 การศึกษา antioxidant ในสารสกัดจากผลพิทูลโดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry (CV)

4.3.1 การศึกษาผลของ pH ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant

ในการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant ที่ขั้ว working electrode ที่เป็น inert material เช่น glassy carbon นั้นจะเกี่ยวข้องกับ electron transfer และมี deprotonation ดังแสดงปฏิกิริยาทั่วไปเป็น



ดังนั้น pH ของสารละลายตัวกลางที่เป็น supporting electrolyte จะมีผลต่อ cyclic voltammogram รวมทั้งความสามารถในการเป็น antioxidant อีกด้วย เมื่อใช้การเปรียบเทียบค่า E_{pa} ของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด ซึ่งค่า E_{pa} ยิ่งมีค่าน้อยแสดงถึงการเกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ก่อนก็จะทำให้มีความสามารถเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี และมีความสามารถในการเป็น antioxidant ที่ดีการรายงานความสามารถในการเป็น antioxidant โดยวิธีนี้จึงต้องมีการระบุชนิดของขั้วไฟฟ้า และสารละลาย supporting electrolyte ด้วย ค่า E_{pa} และ i_{pa} จาก cyclic voltammogram ของสารมาตรฐาน antioxidants ใน supporting electrolyte pH 4.5 7.0 และ 9.0 แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่า E_{pa} และ i_{pa} จาก cyclic voltammogram ของสารมาตรฐาน antioxidants ใน supporting electrolyte pH 4.5 7.0 และ 9.0

Antioxidant (0.4 mM)	0.1 M Acetate buffer pH 4.5		0.05 M Phosphate buffer pH 7.0		0.1 M NH_3/NH_4Cl buffer pH 9.0	
	E_{pa} (V)	i_{pa} (μA)	E_{pa} (V)	i_{pa} (μA)	E_{pa} (V)	i_{pa} (μA)
catechin	0.490	3.655	0.324	4.527	0.112	4.023
	0.802	1.855	0.676	0.949	-	-
EGCG	0.394	4.169	0.258	8.363	0.097	6.631
gallic acid	0.394	9.061	0.414	5.853	0.173	9.233
ascorbic acid	0.470	4.971	0.434	3.424	-	-
trolox	0.309	4.824	0.268	3.996	0.142	4.951
caffeic acid	0.424	9.417	0.399	5.565	0.198	7.342
catechol	0.470	9.769	0.359	9.171	0.112	8.607
Activity sequence	T > EGCG $\approx$ GA > CA > AA $\approx$ Cat > C		EGCG > T > C > Cat > CA > GA > AA		EGCG > C $\approx$ Cat > T > GA > CA	

AA = ascorbic acid, C = catechin, CA = caffeic acid, Cat = catechol, EGCG = epigallocatechin gallate, GA = gallic acid and T = trolox

การศึกษา antioxidant โดยวิธีนี้ได้มีผู้ทำการศึกษาและเรียงลำดับ antioxidant activity ของสารละลายมาตรฐาน [8] [9] [10] และ [23] ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่า E_{pa} ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant จากงานวิจัยอื่นๆ

Antioxidant	E_{pa} (V vs. SCE) ^a	E_{pa} (V vs. SCE) ^b	E_{pa} (V vs. SCE) ^c	E_{pa} (V vs. Ag/AgCl) ^d
Catechin	0.418(0.5 mM)	0.205(0.05 mM)	0.53, 0.88(0.5 mM)	0.215(1.0 mM)
	0.389(0.05 mM)	0.201(0.01 mM)	-	-
EGCG	-	0.123, 0.213(0.05 mM)	-	-
	-	0.122, 0.216(0.01 mM)	-	-
Ascorbic acid	-	-	-	0.167(1.0 mM)
Caffeic acid	0.435(0.5 mM)	-	0.53(0.5 mM)	0.212(1.0 mM)
	0.416(0.05 mM)	-	-	-
Gallic acid	0.418(0.5 mM)	0.236(0.05 mM)	0.54, 0.87(0.5 mM)	0.233(1.0 mM)
	0.391(0.05 mM)	0.218(0.01 mM)	-	-
Activity sequence	$C \approx GA > CA$	EGCG>C>GA	$C \approx CA \approx GA$	AA>CA>C>GA

AA = ascorbic acid, C = catechin, CA = caffeic acid, , EGCG = epigallocatechin gallate and GA = gallic acid

^a In 12 % Ethanol – 0.05 M Tartaric acid pH 3.6, using 3 mm GCE vs, SCE at scan rate 100 mV/s (Kilmartin et al.,2001).

^b In phosphate buffer pH 7.0, using 3 mm GCE vs, SCE at scan rate 100 mV/s (Kilmartin and Hsu,2003).

^c In 0.1% HClO₄ – MeOH (85+15) using GCE vs, SCE at scan rate 20 mV/s (Chiavari et al., 1988).

^d In 1:1 (v/v) water-EtOH containing 50 mM KCl and 50 mM phosphate buffer pH 7.0, using scan rate 20 mV/s (Hotta et al.,2002).

เมื่อใช้การเปรียบเทียบค่า E_{pa} เพื่อเรียงลำดับ antioxidant activity พบว่าในสารละลาย acetate buffer pH 4.5 สามารถเรียงลำดับความสามารถในการเป็น antioxidant ได้ดังนี้ trolox > EGCG $\approx$ gallic acid > caffeic acid > ascorbic acid $\approx$ catechol > catechin ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 สามารถเรียงลำดับความสามารถในการเป็น antioxidant ได้ดังนี้ EGCG > trolox > catechin > catechol > caffeic acid > gallic acid > ascorbic acid และ ในสารละลาย NH_3/NH_4Cl buffer pH 9.0 สามารถเรียงลำดับความสามารถในการเป็น antioxidant ได้ดังนี้ EGCG > catechin $\approx$ catechol > trolox > gallic acid > caffeic acid ส่วน ascorbic acid นั้นจะไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ pH 9 ซึ่งจะแตกต่างไปจากลำดับของ antioxidant activity ในตารางที่ 4.3 เนื่องจากใช้สภาวะของการทดลองต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Kilmartin and Hsu (2003) ซึ่งใช้สภาวะของการทดลองเหมือนกัน จะมี ลำดับของ antioxidant activity เหมือนกันนั่นคือ EGCG > Catechin > Gallic acid

4.3.2 การศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolytes ต่อ cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิทูล

การศึกษานี้ของ supporting electrolyte ต่อ cyclic voltammogram ของสารสกัดจากผลพิทูล โดยใช้ supporting electrolyte เป็น acetate buffer pH 4.5 Phosphate buffer pH 7.3 และ NH_3/NH_4Cl buffer pH 10.8 พบว่าตำแหน่งของศักย์ไฟฟ้า (E_{pa}) และ กระแสไฟฟ้า (i_{pa}) ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากผลพิทูล แก่จัด fraction2 ค่า E_{pa} และ i_{pa} ใน supporting electrolyte แต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่า E_{pa} และ i_{pa} ของสารสกัดจากผลพิทูลแก่จัด fraction2 เข้มข้น 1,308 ppm ในสารละลาย buffer pH ต่างๆ

Supporting electrolyte	E_{pa} (V)	i_{pa} (μA)
Acetate buffer pH 4.5	0.490	7.093
Phosphate buffer pH 7.3	0.444	3.962
NH_3/NH_4Cl buffer pH 10.8	0.329	4.084

พบว่าใน acetate buffer pH 4.5 จะให้ค่ากระแสไฟฟ้าของพีคสูงที่สุด ดังนั้นจึงได้เลือกใช้สารละลาย acetate buffer เป็นสารละลาย supporting electrolyte สำหรับใช้วิเคราะห์ antioxidant activity โดยวิธี CV และ DPV ต่อไป

4.3.3 การเลือกสารมาตรฐาน antioxidant สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง

จากค่า E_{pa} และ i_{pa} ของสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction2 เข้มข้น 1,308 ppm, gallic acid, trolox, epigallocatechin gallate (EGCG), ascorbic acid, caffeic acid และ catechin เข้มข้น 0.4 mM ใน acetate buffer pH 4.5 พบว่าในสารสกัดจากผลพิกุลแก่จัด fraction 2 แม้จะผ่าน alkaline hydrolysis แล้ว จากผลของ TLC และ HPLC ก็ยังมีสาร antioxidant หลายตัวเป็นองค์ประกอบ การหา antioxidant activity จึงหาในรูปแบบรวม ในการวิเคราะห์ antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุลนั้นจะเลือกใช้ gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน เนื่องจากในการศึกษาโดยใช้เทคนิค TLC พบว่าในสารสกัดจากผลพิกุลทุก fraction มี gallic acid เป็นองค์ประกอบ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณอย่างคร่าวๆบนแผ่น TLC แล้วพบว่ามี gallic acid อยู่ปริมาณมากที่สุด gallic acid จึงเลือกใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน และจะรายงาน antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุลในรูป gallic acid equivalent (GAE)

4.3.4 การศึกษาผลของ scan rate ต่อ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

ผลการตรวจสอบ cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน 0.40 mM gallic acid ใน acetate buffer pH 4.5 เมื่อใช้อัตราการให้ศักย์ไฟฟ้าแกเซลล์ไฟฟ้า 10, 30, 50, 70 และ 100 mV/s สามารถบอกลักษณะของกระแสไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาที่ขั้วได้ โดยพลอตกราฟระหว่าง i_{pa} กับ $v^{1/2}$ และ i_{pa} กับ v พบว่ากราฟแสดงการพลอตระหว่าง i_{pa} กับ $v^{1/2}$ เป็นเส้นตรง ส่วนกราฟที่พลอตระหว่าง i_{pa} กับ v พบว่ากราฟเป็นเส้นโค้ง นั่นแสดงว่ากระแสที่เกิดขึ้นจึงเป็นกระแสที่เกิดขึ้นจากการแพร่ (diffusion current) มากกว่าจะเป็นกระแสจากการดูดซับ (absorption current) ซึ่งมีประโยชน์สามารถนำไปใช้ในการทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ เนื่องจากกระแสที่เกิดขึ้นจากการแพร่จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารในช่วงความเข้มข้นกว้างกว่ากระแสจากการดูดซับ

4.3.5 การทำ calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จากเทคนิค cyclic

voltammetry

Calibration graph ของสารมาตรฐาน gallic acid สามารถทำได้สองแบบคือ จากการพลอตค่ากระแสที่ได้จาก cyclic voltammogram (i_{pa}) ณ ศักย์ไฟฟ้า 370 mV/s vs Ag/AgCl กับความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid หรือ พื้นที่ใต้พีค (Q) ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 0.30 – 0.70 V กับความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid พบว่า calibration curve ที่พลอตระหว่าง i_{pa} ที่ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้า 370 mV vs Ag/AgCl กับความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.40 mM ได้สมการเส้นตรง $y = 28.024x + 0.405$ ($R^2 = 0.9989$) ส่วน calibration curve ที่พลอตระหว่าง Q ในช่วงศักย์ไฟฟ้า 300 – 700 mV vs Ag/AgCl กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 0.40 mM ได้สมการเส้นตรง $y = 92.266x + 1.988$ ($R^2 = 0.9975$) จากการพลอต calibration curve ทั้งสองวิธีพบว่า calibration curve ที่ได้จากการพลอตระหว่าง Q กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จะให้ sensitivity สูงกว่า calibration curve ที่ได้จากการพลอตระหว่าง i_{pa} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ประมาณ 3 เท่า ดังนั้นจึงเลือกใช้การพลอตระหว่าง Q กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ในการสร้าง calibration curve เพื่อศึกษา antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิศุลต่อไป

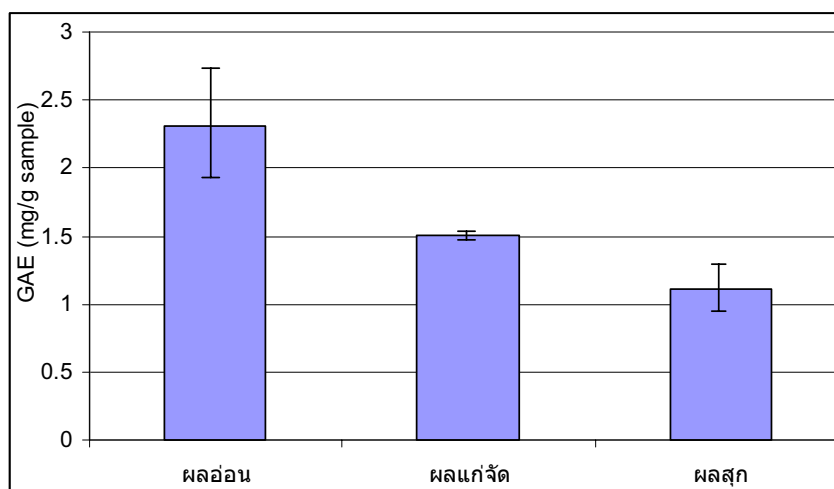
4.3.6 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

เนื่องจากเทคนิค cyclic voltammetry นั้นเป็นเทคนิคที่มี sensitivity ต่ำเมื่อเทียบกับเทคนิค differential pulse voltammetry (DPV) และปริมาณสารที่สกัดได้จากผลพิศุลมีน้อยโดยเฉพาะสารสกัดจาก fraction 1 จะมีปริมาณน้อยที่สุดและไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี cyclic voltammetry ดังนั้นในการวิเคราะห์ antioxidant activity ในตัวอย่างสารสกัดจากผลพิศุลจึงเลือกใช้เทคนิค DPV ซึ่ง calibration curve ที่พลอตระหว่าง พื้นที่ใต้พีค (Q) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 0.01- 0.2 mM พบว่า calibration curve ได้สมการเส้นตรง $y = 1.4593x + 0.0011$ ($R^2 = 0.9987$) ซึ่งเป็นสมการที่ใช้ในการหา antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิศุลต่อไป

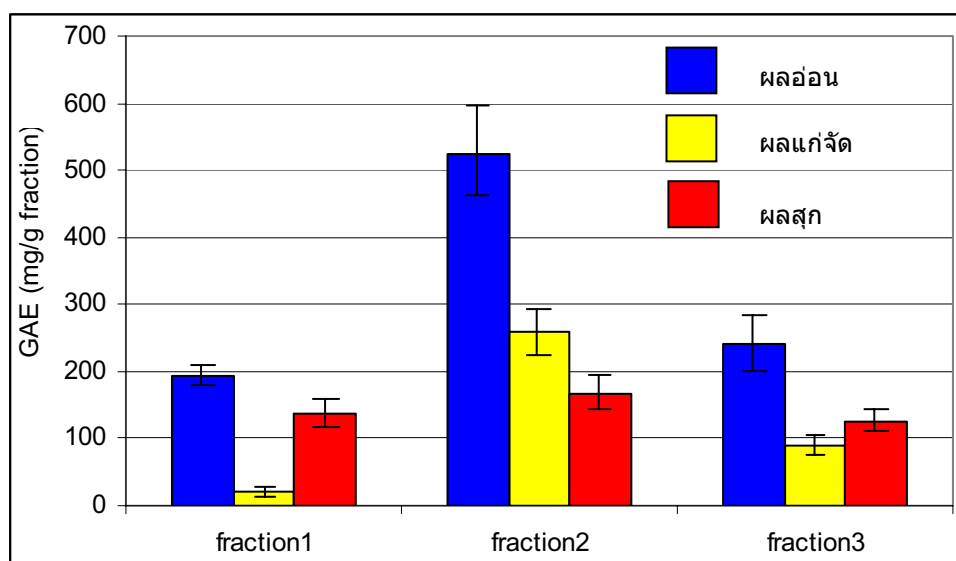
4.3.7 การใช้เทคนิค DPV เพื่อศึกษา antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิทูล

ผลการวิเคราะห์ antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิทูลและรายงานเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg/g sample ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 4.5 และรูปที่ 4.1 – 4.2 ตารางที่ 4.5 ค่า GAE ของสารสกัดจากผลพิทูลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก

ระยะ	fraction	GAE (mg/g) $\pm$ SD
ผลอ่อน	crude extract	2.31 ± 0.44
ผลแก่จัด	crude extract	1.51 ± 0.02
ผลสุก	crude extract	1.11 ± 0.19
ผลอ่อน	F1	195.06 ± 15.46
	F2	525.36 ± 73.66
	F3	240.83 ± 45.53
ผลแก่จัด	F1	20.90 ± 3.91
	F2	259.25 ± 36.98
	F3	88.18 ± 16.72
ผลสุก	F1	137.01 ± 22.99
	F2	167.20 ± 27.26
	F3	126.25 ± 17.71



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงค่า GAE ของ crude extract จากพิทูลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPV



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่า GAE ของ fraction 1 - 3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPV

พบว่าค่า antioxidant activity รายงานในหน่วย GAE ใน crude extract ของพิกุลผลอ่อนมากกว่า ผลแก่จัด และผลสุกตามลำดับ แสดงว่า antioxidant activity ในสารสกัดจากพิกุลผลอ่อนมากกว่า ผลแก่จัดและผลสุก นั้นแสดงว่าในพิกุลมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสาร antioxidant ไปตามระยะต่างๆ และในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของพิกุลผลอ่อน พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ F1 ตามลำดับนั้นแสดงว่าปริมาณ antioxidant activity ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ F1 แสดงว่าในพิกุลผลอ่อน สารประกอบฟีนอลส่วนใหญ่อยู่ในรูป soluble phenolic acid esters ในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของพิกุลผลแก่จัด พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ F1 ตามลำดับนั้นแสดงว่าปริมาณ antioxidant activity ของสารสกัดจาก F2 มากกว่า F3 และ F1 แสดงว่าในพิกุลผลแก่จัด สารประกอบฟีนอลส่วนใหญ่อยู่ในรูป soluble phenolic acid esters และในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของพิกุลผลสุก พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจากพิกุล F1 $\approx$ F2 $\approx$ F3 (t-test ที่ $P = 0.05$) นั้นแสดงว่าปริมาณ antioxidant activity ของสารสกัดจากพิกุลทั้งสาม fraction ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญมาก แสดงว่าในพิกุลผลสุก สารประกอบฟีนอลอยู่ทั้งในรูป free phenolic acids soluble phenolic acid esters และ insoluble-bound phenolic acids

4.4 การศึกษา antioxidant activity โดยวิธี spectrometry

4.4.1 Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical capacity assay (DPPH assay)

4.4.1.1 การศึกษา spectrum และ kinetic behaviors โดย DPPH assay

ใน DPPH assay รีเอเจนต์คือ 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็น free radical ที่มีสีส้มม่วงและมีความเสถียรใน สารละลายเมทานอล สารละลายนี้จะมีสีม่วง ดูดกลืนแสงให้ absorbance สูงสุดที่ 517 nm เมื่อถูกรีดิวซ์จากสาร antioxidant DPPH[•] จะถูกรีดิวซ์กลายเป็น DPPH-H ทำให้ absorbance ที่ 517 nm ลดลง เมื่อศึกษา Kinetic curves โดยบันทึก absorbance ที่ความยาวคลื่น 517 nm เทียบกับเวลา ของ DPPH radical + สารสกัดจากผลพิทูล และ DPPH radical + สารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่า ปฏิกริยาระหว่าง DPPH radical กับสาร antioxidant ที่ศึกษามีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงและเริ่มคงที่หลังจากเวลา ประมาณ 10 นาที ดังนั้นในการทดลอง antioxidant activity ในสารละลายมาตรฐาน และสารสกัด จากผลพิทูลจึงตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

4.4.1.2 การศึกษา antioxidant activity ของสารละลายมาตรฐานโดย DPPH assay

สมการที่ได้จากการพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานชนิดต่างๆ และค่า EC₅₀ ซึ่งหมายถึงปริมาณ antioxidant ที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 สมการ และค่า EC₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน antioxidant ที่ได้จากการทดลอง

สารละลายมาตรฐาน	ค่า EC ₅₀ (ppm)
ascorbic acid	1.792
cafeic acid	1.910
catechin	2.684
catechol	0.765
EGCG	1.192
gallic acid	0.846
trolox	2.577

จากการทดลองเรียงลำดับ EC_{50} จากน้อยไปมากได้ดังนี้ catechol < gallic acid < EGCG < ascorbic acid < caffeic acid < trolox < catechin ตามลำดับ

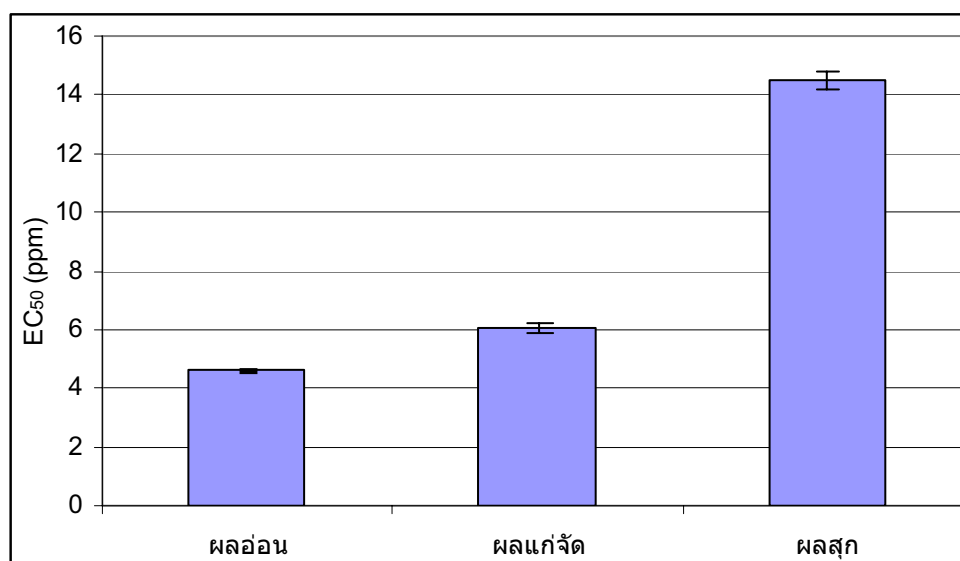
ค่า EC_{50} น้อยแสดงว่าสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำๆก็สามารถลด $DPPH^{\bullet}$ ลง 50% ดังนั้น สารละลายมาตรฐานนี้จึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งเรียงลำดับได้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อยดังนี้ catechol > gallic acid > EGCG > ascorbic acid > caffeic acid > trolox > catechin

4.4.1.3 การศึกษา antioxidant activity ของสารสกัดจากผลพิกุลโดย DPPH assay

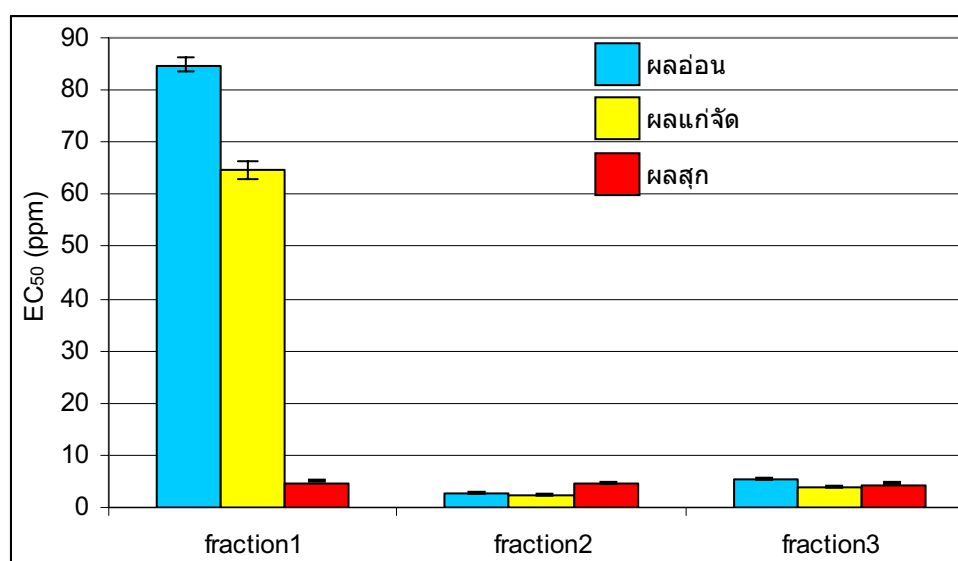
ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิกุลแสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.3 - 4.4

ตารางที่ 4.7 ค่า EC_{50} ของสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัดและ ผลสุกโดย DPPH assay

ระยะ	fraction	EC_{50} (ppm) $\pm$ SD
ผลอ่อน	crude extract	4.62 ± 0.09
ผลแก่จัด	crude extract	6.04 ± 0.12
ผลสุก	crude extract	14.49 ± 0.23
ผลอ่อน	F1	84.68 ± 1.21
	F2	2.72 ± 0.08
	F3	5.40 ± 0.19
ผลแก่จัด	F1	64.74 ± 1.46
	F2	2.11 ± 0.07
	F3	3.65 ± 0.14
ผลสุก	F1	4.60 ± 0.26
	F2	4.54 ± 0.16
	F3	4.06 ± 0.26



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงค่า EC₅₀ ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPPH assay



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่า EC₅₀ ของ fraction 1 – 3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค DPPH assay

พบว่าค่า EC_{50} ของสารสกัดจาก crude extract ของพิกุลผลสุก > ผลแก่จัด > ผลอ่อน ตามลำดับ สรุปความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดังนี้ ผลอ่อน > ผลแก่จัด > ผลสุก ในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของผลพิกุลอ่อนพบว่าค่า EC_{50} ของ $F1 > F3 > F2$ ตามลำดับ สรุปความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดังนี้ $F2 > F3 > F1$ ในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของผลพิกุลแก่จัดพบว่าค่า EC_{50} ของ $F1 > F3 > F2$ ตามลำดับ สรุปความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดังนี้ $F2 > F3 > F1$ และในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของผลพิกุลสุกพบว่าค่า EC_{50} ของ $F1 \approx F2 \approx F3$ (t-test ที่ $P = 0.05$) จากค่า EC_{50} แสดงว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสาม fraction ไม่ต่างกันอย่างมี

4.4.2 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging

assay : (ABTS assay)

4.4.2.1 การศึกษา spectrum และ kinetic behavior วิธี ABTS assays

จาก spectrum ของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็น stable radical ใน aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 nm เมื่อถูก reduce จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดจากพิกุล ผลอ่อน fraction2 จะทำให้ absorbance ที่ 734 nm ลดลง เมื่อศึกษา Kinetic curves โดยบันทึก absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm เทียบกับเวลา ของ $ABTS^{\cdot+}$ + fraction2 เพิ่มขึ้น 4.23 ppm ของพิกุลผลอ่อน และ $ABTS^{\cdot+}$ + สารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าปฏิกิริยาระหว่าง $ABTS^{\cdot+}$ กับ สารสกัดจาก fraction2 เพิ่มขึ้น 4.23 ppm และ สารละลาย มาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ ปฏิกิริยาจะเกิดและให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาครั้งที่เวลา ประมาณ 6 นาที ดังนั้นในการทดลอง antioxidant capacity ในสารละลายมาตรฐาน และสารสกัด จากผลพิกุลจึงตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

4.4.2.2 การศึกษา antioxidant activity สารละลายมาตรฐาน gallic acid

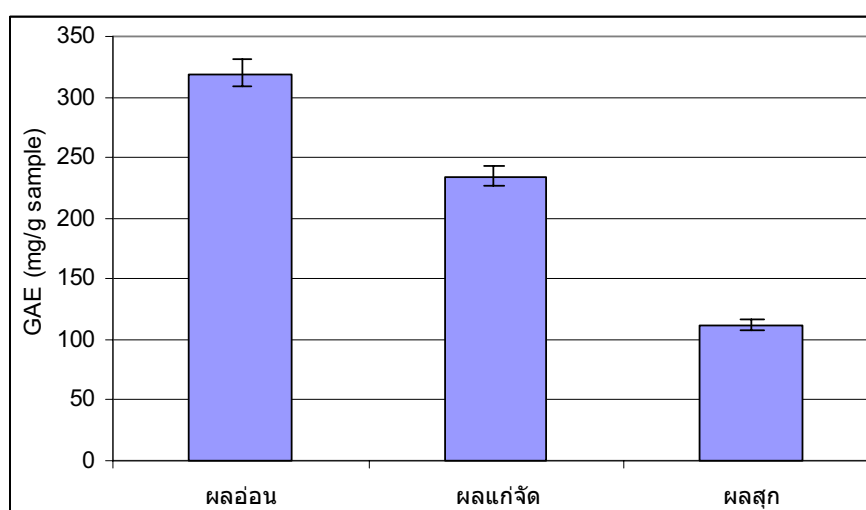
การศึกษา antioxidant activity สารละลายมาตรฐาน gallic acid เพื่อเป็นการหาค่า EC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เพื่อใช้ในการหา antioxidant activity ในสารสกัดจากผลพิกุล โดยคำนวณออกมาเป็น gallic acid equivalent (GAE)ซึ่งค่า EC_{50} เฉลี่ยจากการทดลองซ้ำทั้ง 5 ครั้ง เท่ากับ 1.06 ppm

4.4.2.3 การศึกษา antioxidant capacity ของสารสกัดจากผลพิกุลโดยวิธี ABTS assay

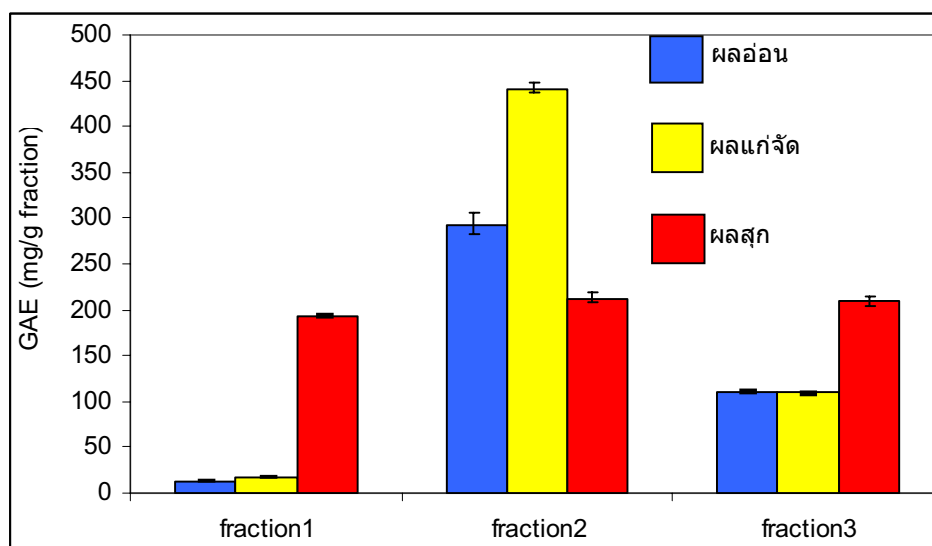
ค่า GAE (mg/g) ของสารสกัดผลพิกุลแสดงดังตารางที่ 4.8 รูปที่ 4.5 - 4.6

ตารางที่ 4.8 ค่า GAE ของสารสกัดผลพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก โดยวิธี ABTS assay

ระยะ	fraction	ค่า GAE (mg/g) $\pm$ SD
ผลอ่อน	crude extract	318.51 ± 12.31
ผลแก่จัด	crude extract	234.07 ± 9.18
ผลสุก	crude extract	111.88 ± 4.87
ผลอ่อน	F1	13.53 ± 0.18
	F2	291.98 ± 10.04
	F3	109.74 ± 0.82
ผลแก่จัด	F1	17.15 ± 0.48
	F2	441.70 ± 4.85
	F3	110.80 ± 2.41
ผลสุก	F1	192.26 ± 1.01
	F2	212.49 ± 4.56
	F3	209.18 ± 5.89



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่า GAE ของ crude extract จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และผลสุก โดยเทคนิค ABTS assay



รูปที่ 4.6 ค่า GAE ของ fraction 1 -3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค ABTS assay

พบว่าค่า antioxidant activity รายงานในหน่วย GAE ของสารสกัดจาก crude extract ของพิกุล ผลอ่อน > ผลแก่จัด > ผลสุก ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดจากผลพิกุลอ่อนมี antioxidant activity มากกว่าผลพิกุลแก่จัดและผลพิกุลสุก ในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของผลพิกุลอ่อนพบว่าค่า GAE ของ F2 > F3 > F1 ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดจากผลพิกุลอ่อน F2 มี antioxidant capacity มากกว่า F3 และ F1 ในสารสกัดจาก fraction 1-3 ของผลพิกุลแก่จัดพบว่าค่า GAE ของ F2 > F3 > F1 ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดจากผลพิกุลผลแก่จัด F2 มี antioxidant capacity มากกว่า F3 และ F1 และในสารสกัดจาก fraction 1 ถึง 3 ของผลพิกุลสุกพบว่าค่า GAE ของแต่ละ fraction มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อใช้การคำนวณทางสถิติคือ t-test และ f-test เพื่อดูแนวโน้มของค่าที่วิเคราะห์ได้พบว่าค่า GAE ของ F2 $\approx$ F3 > F1 แสดงว่าสารสกัดจากผลพิกุลระยะ ผลสุก F2 และ F3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.05$) และมี antioxidant capacity มากกว่า F1

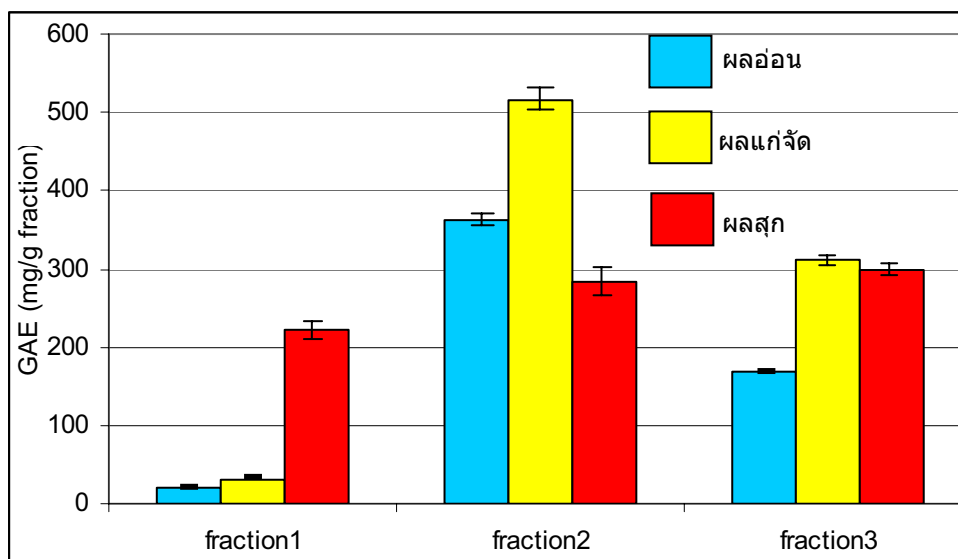
4.4.3 ศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมดในสารสกัดจากผลพิบูลโดย

Folin-Denis assay

Folin-Denis assay ใช้ในการหาปริมาณ Total phenolics compounds อาศัยปฏิกิริยาของ phosphomolybdic-phosphotungstic acid (Folin – Denis reagent) เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับ phenolic compounds เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm หาปริมาณ Total phenolics compounds โดยคำนวณเป็นค่า GAE โดยใช้ gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน ค่า GAE ของสารสกัดจาก ผลพิบูลแสดงดังตาราง 4.9 และรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.9 ค่า GAE ของสารสกัดจาก ผลพิบูล

ระยะ	fraction	ค่า GAE (mg/g) $\pm$ SD
ผลอ่อน	F1	20.1 ± 0.84
	F2	361.93 ± 8.49
	F3	168.81 ± 2.38
ผลแก่จัด	F1	31.70 ± 0.63
	F2	516.91 ± 14.74
	F3	310.92 ± 5.08
ผลสุก	F1	221.56 ± 13.49
	F2	284.16 ± 18.65
	F3	298.51 ± 7.90



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงค่า GAE ของ fraction 1 -3 จากพิกุลผลอ่อน ผลแก่จัด และ ผลสุก โดยเทคนิค Folin-Denis assay

จากค่า antioxidant activity รายงานในหน่วย GAE (mg/g fraction) ของสารสกัดจากผลพิกุลทั้งสามระยะพบว่าปริมาณ total phenolic compounds ในสารสกัดจากพิกุลผลอ่อนและผลแก่จัด F2 มากกว่า F1 และ F3 ตามลำดับ ส่วนในพิกุลผลสุกนั้นพบว่าปริมาณ total phenolic compound ในสารสกัดจากพิกุลผลสุก F2 และ F3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและมีค่ามากกว่า F1

5. สรุปเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ antioxidant activity

antioxidant activity ของสารสกัดจากผลพิกุล จากวิธีวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.10 และ 4.11

ตารางที่ 4.10 ตารางเปรียบเทียบ antioxidant activity โดย DPPH assay และ ABTS assay

ระยะ	DPPH assay	ABTS assay
crude extract	ผลอ่อน > ผลแก่จัด > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่จัด > ผลสุก
ผลพิกุลอ่อน	F2 > F3 > F1	F2 > F3 > F1
ผลพิกุลแก่จัด	F2 > F3 > F1	F2 > F3 > F1
ผลพิกุลสุก	F1 ≈ F2 ≈ F3	F2 ≈ F3 > F1

ตารางที่ 4.11 ตารางเปรียบเทียบ antioxidant activity โดย HPLC DPV และ Folin-Denis assay

ระยะ	HPLC	DPV	Folin-Denis assay
crude extract	-	ผลอ่อน > ผลแก่จัด > ผลสุก	-
ผลพิกุลอ่อน	$F2 > F3 = F1$	$F2 > F3 > F1$	$F2 > F3 > F1$
ผลพิกุลแก่จัด	-	$F2 > F3 > F1$	$F2 > F3 > F1$
ผลพิกุลสุก	-	$F1 \approx F2 \approx F3$	$F2 \approx F3 > F1$

พบว่าวิธีวิเคราะห์ antioxidant โดย DPPH assay และ ABTS assay ให้ผลการวิเคราะห์ที่คล้ายกันทั้งนี้อาจเนื่องจากวิธีทั้งสองวิเคราะห์โดยใช้การทำปฏิกิริยาของ antioxidant กับ radical แล้วตรวจวัดปริมาณ radical ที่เหลืออยู่เหมือนกัน ส่วนเทคนิค DPV และ Folin-Denis assay จะเป็นการวิเคราะห์ antioxidant ในรูปแบบรวมก็ให้ผลที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันและให้ลำดับของ antioxidant ที่คล้ายกันกับวิธี DPPH assay และ ABTS assay ส่วนวิธี HPLC นั้นเป็นการวิเคราะห์ antioxidant activity โดยการวิเคราะห์เป็นปริมาณ gallic acid เพียงอย่างเดียวจึงให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างไปจากวิธีอื่นๆ จึงสามารถใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า (DPV) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ antioxidant activity ในสารสกัดจากพืชได้ ซึ่งเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้าเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ใช้สารเคมีน้อย ประหยัด และเป็นการวิเคราะห์สาร antioxidant ในตัวอย่างโดยตรง แต่เทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์ antioxidant ในรูปแบบรวม ไม่สามารถวิเคราะห์แยกเป็นแต่ละตัวหนึ่งได้

เอกสารอ้างอิง

1. Ronald, L.P., Xianli, W. and Karen S., *J. Agric. Food Chem.*, **53** (2005) 4290-4302.
2. Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. and Kanazawa, K., *J. Agric. Food Chem.*, **51** (2003) 571-581.
3. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, Z. and Robards, K., *Analyst.*, **127** (2002) 183-198.
4. Misra, G. and Mitra, C.R., *Phytochem.*, **6** (1967) 453.
5. Sahu, N.P., Koike, K., Jia, Z. and Nikaïdo, T., *Tetrahedron.*, **51** (1995) 13435-13446.
6. Sen, S., Sahu, N.P. and Mahato, S.B., *Phytochem.*, **38** (1995) 205-207.
7. Sahu, N.P., Koike, K., Jia, Z. and Nikaïdo, T., *Phytochem.*, **44** (1997) 1145-1149.
8. Kilmartin, P.A., Zou, H. and Waterhouse, A.L., *J. Agric. Food Chem.*, **49** (2001) 1957-1965.
9. Hotta, H., Nagono, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, J. and Osakai, T., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1572** (2002) 123-132.
10. Kilmartin, P.A. and Hsu, C.F., *Food Chem.*, **82** (2003) 501-512.
11. Hotta, H., Ueda, M., Nagono, S., Tsujino, Y., Koyama, J. and Osakai, T., *Anal. Biochem.*, **303** (2002) 66-72.
12. Janeiro, P. and Oliveira Brett, A.M., *Anal. Chim. Acta.*, **518** (2004) 109-115.
13. Hosseiny Davarani, S.S., Nematollahi, D. and Shamsipur, M., *J. Electroanal. Chem.*, (2005) in press.
14. Mu, S., *Synth. Met.*, **139** (2003) 287-294.
15. Hu, I-F. and Kuwana, T., *Anal. Chem.*, **58** (1986) 3235-3239.
16. Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. and Kefalas, P., *Food Chem.*, **89** (2005) 27-36.
17. Duan, X-J., Zhang, W-W., Li, X-M. and Wang, B-G., *Food Chem.*, **95** (2006) 37-43
18. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, Min. and Rice-Evans C., *Free Radica. Biol. Med.*, **26** (1999) 1231-1237.
19. Arts, M.J.T.J., Dallinga, J.S., Voss, H-P., Haenen, G.R.M.M. and Bast, A., *Food Chem.*, **88** (2004) 567-570.

20. Erdemoglu, S.B., Pyrzyniska, K. and Gucer, S., *Anal. Chim. Acta.*, **411** (2000) 81-89.
21. Krygier, K., Sosulski, F. and Hogge, L., *J. Agric. Food Chem.*, **30** (1982) 330-334.
22. Cheung, L.M. and Cheung, P.C.K., *Food Chem.*, **89** (2005) 403-409.
23. Chiavari, G. Concialini, V. and Galletti, G., *Analyst.*, **113** (1988) 91 – 94.
24. Bard, A.J. and Faulkner, L.R., “Electrochemical methods Fundamentals and Applications” 2nd.ed., Wiley & Sons, Inc., New York 2001, pp. 284-286.

ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ-สกุล นายชัยยันต์ บุญยืน
 ที่อยู่ 392 หมู่ 10 ตำบลชัยเกษม อำเภอบางสะพาน จังหวัด
 ประจวบคีรีขันธ์ 77190
- ประวัติการศึกษา
 พ.ศ. 2545 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกเคมี
 จากมหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม
 พ.ศ. 2547 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเคมีวิเคราะห์
 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
- การเสนอผลงานวิจัย
- ระดับนานาชาติ
1. R. Chaisuksant, A. Buranapithak, P. Buasod, C. Boonyuen, and J. Sairuamyart, Proceedings of the APEC Symposium 2005 on Assuring Quality and Safety of Fresh Produce, Bangkok, August1-3, 2005. pp. 441-451.
 2. R. Chaisuksant, C. Boonyuen and O. Suntornwat. “Radical Scavenging Tests of Phenolic Fractions from Mimosa elengi Fruits”. The International Workshop on Tropical and Subtropical Fruits, Chiang Mai, November 27-30, 2006.
- ระดับประเทศ
1. C. Boonyuen, O. Suntornwat and R. Chaisuksant. “Determination of Antioxidant Capacity of Pikul Fruit Extract”. The 6th National Horticultural Congress, Chiang Mai, November 7-10, 2006.
 2. C. Boonyuen, O. Suntornwat and R. Chaisuksant, “Determination of Antioxidant Capacity of Pikul Fruit Extracts”. The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, October 10-12, 2006.