



การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นของขิง

โดย

นางสาวอังคณา พูลเกษม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของขิง

โดย

นางสาวอังคณา พูลเกษม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS OF GINGER**

**By**

**Angwara Poolkasem**

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

**MASTER OF SCIENCE**

**Department of Chemistry**

**Graduate School**

**SILPAKORN UNIVERSITY**

**2008**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การวิเคราะห์  
ความสามารถในการด้านออกซิเดชันของจิง ” เสนอโดย นางสาวอังก์วรา พูลเกษม เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัศมี ชัยสุขสันต์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

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

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัศมี ชัยสุขสันต์)

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

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรงค์ ฉิมพาลี)

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

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา)

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

49310203: สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์

คำสำคัญ : จิง/ สารต้านออกซิเดชัน / ไซคลิกโวลแทมเมตรี/ABTS assay/ FI-ECD

อังคัร่า พูลเกษม : การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของจิง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.รัศมี ชัยสุขสันต์ 153 หน้า

งานวิจัยนี้วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของจิง โดยใช้ขิงสกัดสองแบบคือสกัดด้วยตัวทำละลาย อะซีโตน : เมทานอล : น้ำ (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) และสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 °C แบบระบบปิดและระบบเปิด ทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยเทคนิค cyclic voltammetry เปรียบเทียบกับเทคนิค 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay (ABTS assay) และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยวิธี Folin-Denis assay จากนั้นพัฒนาวิธี flow injection electrochemical detection (FI-ECD) สำหรับตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสาร ABTS ผลที่ได้จากทุกวิธีรายงานเป็นค่า gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg gallic acid/g dried sample จากผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่าสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยตัวทำละลาย อะซีโตน : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่าสารสกัดจากเปลือกจิง สารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าแบบระบบปิดประมาณ 1-4 เท่าจากทุกวิธี และผลของอุณหภูมิในการสกัดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่า GAE ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 °C แต่ค่า GAE ลดลงที่อุณหภูมิ 40 และ 80 °C สำหรับการสกัดด้วยน้ำแบบระบบเปิด ส่วนการสกัดด้วยน้ำแบบระบบปิดพบว่าที่ 70, 80 °C ได้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด จากงานวิจัยนี้เทคนิค cyclic voltammetry และ FI-ECD เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างได้เช่นเดียวกับวิธีอื่น

---

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....

49310203: MAJOR: ANALYTICAL CHEMISTRY

KEY WORD: GINGER/ ANTIOXIDANT/ CYCLIC VOLTAMMETRY/ ABTS ASSAY/ FI-ECD

ANGWARA POOLKASEM: ANTIOXIDANT ACTIVITY ANALYSIS OF GINGER

THESIS ADVISOR: ASST. PROF. RASAMEE CHAISUKSANT, Ph.D. 153 pp.

In this study, the antioxidant activities of ginger extracted by acetone : methanol : water (7:7:6 v/v) and ginger infusion in the temperature range of 40-80 °C were evaluated by cyclic voltammetry (CV) in parallel with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay (ABTS assay). Total phenolic compounds were determined by Folin-Denis assay. Flow injection-electrochemical detection (FI-ECD) was developed to determine antioxidant activity based on electrochemical behavior of ABTS reagent. The antioxidant activities from all assays were expressed as gallic acid equivalent (GAE) in mg/ dried weight sample. Ginger rhizome flesh extracted with acetone: methanol: water (7:7:6 v/v) was found to have higher antioxidant activity than its peel. Ginger infusions by open system preparation resulted in about 1-4 times lower antioxidant activities than the close system preparation from all methods. No significant difference between the mean values of the antioxidant activity in GAE unit was found at infusion temperatures 50, 60, 70 °C but the GAE value decreased at 40 and 80 °C of ginger infusions by the open system preparation. The highest antioxidant activities of ginger infusion by the close system preparation were found at 70 and 80 °C. From this study the cyclic voltammetry and FI-ECD were found to be the promising alternative methods for antioxidant activity analysis.

---

Department of Chemistry      Graduate School, Silpakorn University      Academic Year 2008

Student's signature.....

Thesis Advisor's signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้ทำการวิจัยต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัศมิ์ ชัยสุขสันต์ อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนวคิด คำแนะนำ จัดหาอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงาน และสละเวลาในการตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ด้วยความดูแลเอาใจใส่ตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณอาจารย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรงค์ ฉิมพาลี ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด คำแนะนำ เกี่ยวกับระบบ Flow injection analysis

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี ประธานกรรมการและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ นาคะปรีชา กรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจแก้ไข และให้แนวคิดรวมทั้ง คำแนะนำอันมีคุณค่าแก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมีและอุปกรณ์การทดลองต่างๆ ตลอดงานวิจัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญรูป .....	ฐ
<b>บทที่</b>	
1 บทนำ.....	1
อนุมูลอิสระ (free radical) และสารที่เกี่ยวข้อง .....	1
สารต้านออกซิเดชันในธรรมชาติ .....	4
ข้อมูลทั่วไปของขิง .....	6
วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน	
โดย voltammetry .....	12
วิธี ABTS assay .....	19
วิธี Folin-Denis assay .....	21
เทคนิค Flow injection analysis (FIA) .....	22
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	24
2 สารเคมีและเครื่องมือ.....	25
เครื่องมือ / อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง .....	25
สารเคมี .....	26
การเตรียมสารละลาย .....	27
ตัวอย่าง .....	28
3 การทดลองและผลการทดลอง .....	29
การสกัดขิง.....	29
การวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในสารสกัดจากขิง โดยเทคนิค	
cyclic voltammetry (CV) .....	30
การวิเคราะห์ antioxidant activity ABTS assay .....	42
การหาปริมาณ total phenolic compounds ในสารสกัดจากขิงด้วยเทคนิค	
Folin-Denis assay .....	61

บทที่	หน้า
การวิเคราะห์ antioxidant activity โดยเทคนิค	
Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD) .....	66
4  สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	111
การวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในสารสกัดจากขิงโดยเทคนิค	
cyclic voltammetry (CV) .....	111
การวิเคราะห์ antioxidant activity ABTS assay .....	114
การหาปริมาณ total phenolic compounds ในสารสกัดจากขิงด้วยเทคนิค	
Folin-Denis assay .....	117
การวิเคราะห์ antioxidant activity โดยเทคนิค	
Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD) .....	120
การเปรียบเทียบผลการทดลองจากวิธีวิเคราะห์ต่างๆ .....	122
บรรณานุกรม .....	128
ภาคผนวก .....	132
ประวัติผู้วิจัย .....	153

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อนุโมลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง .....	2
2	Detector และเทคนิคที่ใช้ร่วมกับ Flow injection analysis .....	22
3	รายชื่อสารเคมี บริษัทผู้ผลิต และเกรด .....	26
4	ค่า anodic peak potential ( $E_{pa}$ ) และ anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารตัวอย่าง เข้มข้น 1.67% (w/v) ใน supporting electrolyte ต่างๆ .....	33
5	ค่า anodic peak potential ( $E_{pa}$ ) และ anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.40 mM ใน supporting electrolyte ต่างๆ .....	34
6	ค่า anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน phosphate buffer pH 7.0 .....	36
7	ข้อมูล anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารสกัดจากเนื้อและเปลือกขิง โดยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O (n = 3) .....	39
8	ข้อมูล anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (n = 3) .....	40
9	ข้อมูล anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (n = 5) .....	40
10	ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อและเปลือกขิงโดยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O (n = 3) .....	40
11	ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ (n = 3) ..	41
12	ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (n = 5) ..	41
13	ปริมาตรสารละลายตัวอย่างกับสารละลาย ABTS <sup>+</sup> radical และน้ำ ที่ใช้ใน ABTS assay .....	44
14	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical ของสารมาตรฐาน gallic acid โดย ABTS assay (n = 3) .....	45
15	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเปลือกขิง สกัดด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O โดยวิธี ABTS assay (n = 3) .....	46

ตารางที่	หน้า	
16	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิง สกัดด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O โดยวิธี ABTS assay (n = 3).....	47
17	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 40 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3).....	47
18	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 50 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3).....	48
19	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 60 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3).....	48
20	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 70 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3).....	49
21	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3).....	49
22	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5).....	50
23	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 50 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5).....	50
24	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 60 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5).....	51
25	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 70 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5).....	51
26	ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5).....	51
27	ค่า EC <sub>50</sub> ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อชิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O ที่ โดย ABTS assay (n = 3).....	58
28	ค่า EC <sub>50</sub> ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 3).....	59
29	ค่า EC <sub>50</sub> ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 5).....	59

ตารางที่	หน้า
30	ค่า GAE ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อขิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O ที่ โดย ABTS assay (n = 3) ..... 60
31	ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 3)..... 60
32	ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 5)..... 61
33	ค่า absorbance ที่ 728 nm ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid..... 64
34	ค่า absorbance และค่าปริมาณ total phenolic compound ในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อขิง ด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O( 7:7:6 ) โดย Folin-Denis assays (n = 3) ..... 65
35	ค่า GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ โดย Folin-Denis assays (n = 3) ..... 65
36	ค่า GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ โดย Folin-Denis assays (n = 5) ..... 66
37	ข้อมูล peak potential (E <sub>p</sub> ) และ peak current (i <sub>p</sub> ) จาก cyclic voltammogram ของ ABTS <sup>+</sup> radical ใน supporting electrolyte ต่างกัน..... 68
38	ข้อมูล peak potential และ peak current จาก cyclic voltammograms ของ 1.68 mM ABTS <sup>+</sup> radical ที่ scan rate ต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0 ..... 71
39	ค่า peak potential และ peak current จาก cyclic voltammogram ของ ABTS <sup>+</sup> radical ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0 ..... 74
40	ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS <sup>+</sup> radical เป็น 0.50 - 1.20 mM..... 84
41	ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า R <sup>2</sup> เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS <sup>+</sup> radical ต่างกัน ..... 86
42	ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้อัตราการไหล (flow rate) ที่แตกต่างกัน ..... 89
43	ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า R <sup>2</sup> เมื่อใช้อัตราการไหลต่างกัน ..... 92

ตารางที่	หน้า
44	ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้ ความยาวของ reaction coil แตกต่างกัน ..... 95
45	ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า $R^2$ เมื่อใช้ความยาวของ reaction coil ต่างกัน . 99
46	ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้ injection volume ต่างกัน ..... 102
47	ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า $R^2$ เมื่อใช้ injection volume ต่างกัน..... 107
48	ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคและความเข้มข้นของ gallic acid..... 109
49	ความสูงของพีคเมื่อฉีดตัวอย่างของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ..... 110
50	ค่า antioxidant activity ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ..... 110
51	ค่า GAE ของสารสกัดจากชิงวิเคราะห์โดยเทคนิค cyclic voltammetry ..... 112
52	ค่า $EC_{50}$ และค่า GAE ของสารสกัดจากชิง วิเคราะห์โดยเทคนิค ABTS assay ..... 115
53	ค่าปริมาณ total phenolic compounds ในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากชิง วิเคราะห์โดยเทคนิค Folin-Denis assay..... 118
54	สภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD)..... 120
55	ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิด วิเคราะห์โดยเทคนิค FI-ECD..... 121
56	ค่า Correlation coefficient (r) ที่ได้จากการเปรียบเทียบแต่ละเทคนิคที่ใช้ในการ วิเคราะห์สารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ ..... 126
57	ค่า F-test ของเทคนิค FI-ECD เทียบกับ ABTS assay, cyclic voltammetry, Folin-Denis assay สำหรับสารสกัดจากเนื้อชิงที่อุณหภูมิ 70 °C..... 127

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของ (A) cinnamic acid (B) caffeic acid .....	5
2	โครงสร้างของ (A) ฟลาเวอน (B) (+)-catechin.....	5
3	ลักษณะของต้นขิงและเหง้าขิง .....	7
4	องค์ประกอบหลักของขิง .....	8
5	โครงสร้างและความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบหลักของขิง .....	10
6	Potential waveform ของ cyclic voltammetry.....	12
7	Response signal voltammogram จากเทคนิค cyclic voltammetry ของปฏิกิริยาที่ขั้วใช้งานแบบผันกลับได้.....	13
8	เซลล์เคมีไฟฟ้าของเทคนิค cyclic voltammetry .....	13
9	Potential excitation signal ของ chronoamperometry .....	15
10	Response signal (chronoamperogram) ของเทคนิค chronoamperometry .....	16
11	โครงสร้างของ gallic acid และอนุพันธ์.....	18
12	สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) (ABTS).....	19
13	การเกิด $ABTS^{\bullet+}$ radical และ $ABTS^{2+}$ จากการเสียอิเล็กตรอนของ ABTS .....	20
14	รูปแบบของ (a) Single line flow injection analyzer, (b) Recorder output .....	23
15	Cyclic voltammogram จากการทำ electrode pretreatment ขั้ว GCE โดย cycling potential ใน 0.1 M $NaHCO_3$ 10 รอบ .....	31
16	Cyclic voltammograms ของ supporting electrolyte และสารสกัดจากขิง ใน acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 7.0 และ $NH_3/NH_4Cl$ buffer pH 9.0.....	32
17	Cyclic voltammograms ของ supporting electrolyte และสารมาตรฐาน gallic acid 0.04 mM ใน acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 7.0 และ $NH_3/NH_4Cl$ buffer pH 9.0.....	33
18	Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากขิงและสารมาตรฐาน gallic acid ใน phosphate buffer pH 7.0.....	35
19	Cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0.....	36

รูปที่		หน้า
20	พลอตระหว่าง anodic peak current ( $i_{pa}$ ) กับความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐาน gallic acid ใน phosphate buffer pH 7.0 จากเทคนิค cyclic voltammetry .....	37
21	Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อจึงโดยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O .....	38
22	Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ .....	38
23	Spectrum ของ ABTS <sup>+</sup> • reagent และ ABTS <sup>+</sup> • reagent ผสมกับสารต้านออกซิเดชัน .....	43
24	Kinetic curve ของ ABTS <sup>+</sup> • reagent และ ABTS <sup>+</sup> • reagent ผสมกับสารต้านออกซิเดชัน .....	43
25	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน gallic acid.....	46
26	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเปลือกจึงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O .....	52
27	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเนื้อจึงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H <sub>2</sub> O.....	53
28	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 40 °C.....	53
29	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 50 °C.....	54
30	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 60 °C.....	54
31	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 70 °C.....	55
32	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 80 °C.....	55
33	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> • radical (%R) กับความเข้มข้นของ สารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40 °C.....	56

รูปที่		หน้า
34	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 50 °C.....	56
35	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 60 °C .....	57
36	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 70 °C.....	57
37	พลอตระหว่าง % Remaining ABTS <sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 80 °C.....	58
38	Spectrum ของ Folin-Denis reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดชิง .....	62
39	Kinetic curve ของ Folin-Denis reagent และ Folin-Denis reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดชิง.....	63
40	Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยเทคนิค Folin-Denis Assay .....	64
41	Cyclic voltammograms ของ ABTS <sup>+</sup> radical ใน acetate buffer pH 4.5 และ phosphate buffer pH 7.0 .....	68
42	Cyclic voltammogram ของ 1.68 mM ABTS <sup>+</sup> radical ที่ scan rate ต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0.....	70
43	พลอตระหว่าง $i_{pa}$ , $i_{pc}$ กับ $(\text{Scan rate})^{1/2}$ จาก cyclic voltammogram ของ 1.68 mM ABTS <sup>+</sup> radical ใน phosphate buffer pH 7.0 .....	72
44	พลอตระหว่าง $\log(i_{pa})$ , $\log(i_{pc})$ กับ $\log(\text{Scan rate})$ จาก cyclic voltammogram ของ 1.68 mM ABTS <sup>+</sup> radical ใน phosphate buffer pH 7.0 .....	72
45	Cyclic voltammogram ของ ABTS <sup>+</sup> radical ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0 .....	74
46	Calibration curve ของ ABTS <sup>+</sup> radical ใน phosphate buffer pH 7.0.....	75
47	ส่วนประกอบของเซลล์ตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้า .....	76
48	ลักษณะของเซลล์ตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้าพร้อมขั้วไฟฟ้า.....	77
49	(A) ฝั่ง (manifold) ของ Flow Injection system	
	(B) อุปกรณ์ใน Flow Injection system .....	77

รูปที่		หน้า
50	ผัง (manifold) ของ Flow Injection system สำหรับศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้า .....	78
51	สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ระบบ flow เมื่อให้ ค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ต่างกันและยังไม่มีสารฉีดตัวอย่าง .....	79
52	สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ระบบ flow เมื่อให้ ค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ต่างกันและมีการฉีด gallic acid .....	79
53	สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS <sup>+</sup> • Radical เป็น (A) 0.50, (B) 0.70, (C) 1.00 และ (D) 1.20 mM .....	81
54	Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS <sup>+</sup> • radical เป็น (A) 0.50, (B) 0.70, (C) 1.00 และ (D) 1.20 mM .....	84
55	สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้อัตราการไหลเท่ากับ (A) 1.0, (B) 1.5, (C) 2.2 , (D) 2.6 mL/min .....	87
56	Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้อัตราการไหลต่างกัน (A) 1.0, (B) 1.5, (C) 2.2 , (D) 2.6 mL/min .....	90
57	สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ความยาวของ reaction coil คือ (A) 100, (B) 150, (C) 200, (D) 250 และ (E) 300 cm.....	93
58	Calibration curve ของ gallic acid ใช้ความยาวของ reaction coil ต่างๆ คือ (A) 100, (B) 150, (C) 200, (D) 250, และ (E) 300 cm .....	96
59	สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ injection volume ต่างกันคือ (A) 100, (B) 137, (C) 150, (D) 250, (E) 500 และ (F) 750 $\mu$ L.....	100
60	Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ injection volume ต่างกันคือ (A) 100, (B) 137, (C) 150, (D) 250, (E) 500 และ (F) 750 $\mu$ L.....	104
61	สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm และตัวอย่างสารสกัดจาก เนื้อหิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40-80 °C (1-5).....	108
62	Calibration curve ของ gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm.....	109

รูปที่		หน้า
63	กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิง และเปลือกขิงด้วยตัวทำละลาย acetone: methanol : H <sub>2</sub> O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) โดยเทคนิค cyclic voltammetry .....	113
64	กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดและระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค cyclic voltammetry .....	113
65	กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิง และเปลือกขิงด้วยตัวทำละลาย acetone: methanol: H <sub>2</sub> O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) โดยเทคนิค ABTS assay .....	116
66	กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดและระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค ABTS assay .....	116
67	กราฟแสดงปริมาณ total phenolic compound ในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อขิงและเปลือกขิงด้วยตัวทำละลาย acetone: methanol : H <sub>2</sub> O (7:7:6 v/v) โดยเทคนิค Folin-Denis assay .....	119
68	กราฟแสดงปริมาณ total phenolics compound ในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดและระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค Folin-Denis assay .....	119
69	กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค FI-ECD .....	121
70	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (°C) กับค่า GAE (mg/ g dried sample) จากเทคนิคต่างๆ.....	122
71	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค ABTS assay และ Cyclic voltammetry ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ .....	123
72	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค ABTS assay และ Folin-Denis assay ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ .....	123
73	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค ABTS assay และ FI-ECD ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ .....	124

รูปที่	หน้า
74	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค Folin-Denis assay และ Cyclic voltammetry ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ ..... 124
75	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค Folin-Denis assay และ FI-ECD ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ ..... 125
76	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค Cyclic voltammetry และ FI-ECD ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ ..... 125

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 อนุมูลอิสระ (free radical) และสารที่เกี่ยวข้อง

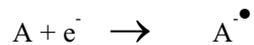
อนุมูลอิสระ หรือ อนุมูล [1] ได้แก่ สารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวเป็นอิสระไม่มีคู่ และมีสารหลายชนิดที่ไม่อยู่ในสถานะอนุมูล แต่มีความเกี่ยวข้องหรือเป็นผลผลิตของอนุมูล และมีความไวต่อปฏิกิริยาสูง ดังแสดงดังตารางที่ 1 สารเหล่านี้มีทั้งที่เป็นสารที่ทำให้กำเนิดอนุมูล เนื่องจากมีความคงตัวต่ำ สลายตัวได้ง่าย เช่น โอโซน หรือสารที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นเกิดเป็นอนุมูล เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมถึงสารที่เป็นผลผลิตของอนุมูลที่มีอันตรายสูง ได้แก่ เปอร์ออกซิไนเตรท ซึ่งเรียกโดยรวมว่าสารไวต่อปฏิกิริยา (reactive species, RS)

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

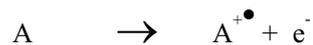
ก. การแตกของพันธะ โควาเลนต์แบบไฮโมไลซิส



ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลาง ทางไฟฟ้า



ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า



ตารางที่ 1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
<b>Reactive oxygen species (ROS,RS)</b>	
Superoxide, $O_2^{\bullet -}$	Hydrogent peroxide, $H_2O_2$
Hydroxyl, $O^{\bullet}$	Hypobromous acid, HOBr
Hydroperoxyl, $HO_2^{\bullet}$	Hypochlorous acid, HOCl
	Ozone, $O_3$
Peroxyl, $RO_2^{\bullet}$	Singlet oxygen ( $O_2^1 \Delta g$ )
Alkoxyl, $RO^{\bullet}$	Organic peroxide, ROOH
Carbonate, $CO_3^{\bullet -}$	Peroxynitrite, $ONOO^-$
Carbon dioxide, $CO_2^{\bullet -}$	Peroxynitrous acid, ONOOH
<b>Reactive nitrogen species (RNS)</b>	
Nitric oxide, $NO^{\bullet}$	Nitrous acid, $HNO_2$
Nitrogen dioxide, $NO_2^{\bullet}$	Nitroxyl cation, $NO^+$
	Nitroxyl anion, $NO^-$
	Dinitrogen tetroxide, $N_2O_4$
	Dinitrogen trioxide, $N_2O_3$
	Peroxynitrite, $ONOO^-$
	Peroxynitrous acid, ONOOH
	Nitronium (nitryl) cation, $NO_2^+$
	Alkyl peroxynitrites, ROONO
<b>Reactive chlorine species (RCS)</b>	
Atomic chlorine, $Cl^{\bullet}$	Hypochlorous acid, HOCl
	Nitryl (nitronium) chloride, $NO_2Cl$
	Chloramines
	Chlorine gas ( $Cl_2$ )

อนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^{\bullet-}$ ) และอนุมูลไฮดรอกซี ( $OH^{\bullet}$ ) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่น ๆ ส่วน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ เปอร์ออกซีไนไตรท์ ( $ONOO^{\bullet}$ ) แม้ว่าโครงสร้างไม่อยู่ในอนุมูลอิสระแต่เป็นสารที่ได้จากปฏิกิริยาต่อเนื่องที่มีอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ สารที่ไม่ได้อยู่ในรูปอนุมูลเหล่านี้มีบทบาทในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมาก และมีความเป็นพิษสูง จึงมีการบัญญัติศัพท์ขึ้นมาใหม่ให้ครอบคลุมทั้งอนุมูลอิสระและสารที่ว่านี้ว่าสารความไวสูง (reactive species, RS) อนุมูลอิสระเกิดได้จากหลายสาเหตุ ดังนี้

1. ไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติ
2. กระบวนการเมตาบอลิซึม
3. กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาท
4. เมตาบอลิซึมของสารสื่อประสาท
5. สารพิษต่อเซลล์ประสาท (Neurotoxin)
6. ภาวะขาดเลือด (Ischemia / Reperfusion, I/R)
7. ภาวะช็อกและการอักเสบ

#### กลไกการเกิดความเสียหายความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยอนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยเข้าจับคู่กับอิเล็กตรอนของชีวโมเลกุล หรือดึงอิเล็กตรอน หรืออะตอมไฮโดรเจนออกจากชีวโมเลกุลนั้น กล่าวคือชีวโมเลกุลคือ ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ ถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระ ทำให้คุณสมบัติและการทำงานของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไปเกิดความบกพร่อง หรือถูกทำลาย อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรค อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและหลุดลอดออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันก่อให้เกิดความเสียหาย และมีผลกระทบต่อกระบวนการที่นำไปสู่การแสดงออกทางคลินิก โดยโรคที่มีการยืนยันอย่างกว้างขวางว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งของโรค และมีบทบาทสำคัญที่ทำให้โรคกำเริบมากขึ้น ได้แก่ โรคหัวใจและสมองขาดเลือด โรคความผิดปกติในระบบประสาท และโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคความผิดปกติในระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคมะเร็ง

#### การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกาย มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษประกอบด้วยอนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์โดยออกฤทธิ์ที่ต่ำมากไม่เกิดสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุม

ปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ หากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลอิสระและสารออกซิแดนท์มีมากเกินไปเกินสมดุล เรียกสภาวะนี้ว่า Oxidative stress และทำให้เกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้ กลไกที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้แก่

**1. เอนไซม์** ในระดับ เซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx)

### 2. สารคีเลทโลหะ (Metal chelator)

การจัดโลหะทรานซิชันโดยใช้สารคีเลทโลหะ เป็นอีกกลไกหนึ่งที่ใช้ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชัน เช่น ธาตุเหล็ก และ ทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารคีเลท โลหะในร่างกายส่วนใหญ่เป็นโปรตีนทำหน้าที่จับโลหะทรานซิชันที่ก่อให้เกิด  $\text{OH}^\bullet$  เข้ารวมไว้ในโครงสร้างโดยอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้

**3. สารต้านอนุมูลอิสระ** เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ โดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ

## 1.2 สารต้านออกซิเดชันในธรรมชาติ

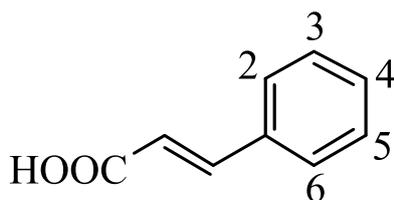
สารประกอบในกลุ่ม polyphenol เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ จัดเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ได้รับจากภายนอก และพบได้มากในธรรมชาติอันได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ชอกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น พบ phenolic compound มากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ นับจากโมเลกุลอย่างง่าย เช่น phenolic acid, phenylpropanoid และ flavonoid ไปจนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น lignin, melanin, tannin เป็นต้น

โครงสร้างทั่วไปของ phenolic compound ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวง aromatic และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี อย่างน้อย 1 หมู่ ถือเป็น secondary metabolites ของพืชผัก โดยในที่นี้จะกล่าวถึง คุณสมบัติทางโครงสร้างที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มนี้ โดยจะกล่าวเฉพาะสารกลุ่มที่สำคัญได้แก่ phenolic acid และ flavonoid ต่างๆ ที่สำคัญและพบบ่อย

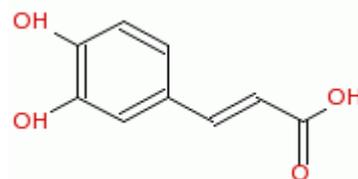
**Polyphenol** [2] แบ่งเป็น 3 ชนิดได้แก่ phenolic acid, flavonoid และ stilbenes กับ lignan ซึ่งพบน้อยที่สุด

Phenolic acid ที่พบบ่อยตามพืชทั่วไปคืออนุพันธ์ของ cinnamic acid โดยโครงสร้างของ cinnamic acid แสดงในรูปที่ 1(A) ตัวอย่างอนุพันธ์ของ cinnamic acid เช่น caffeic acid แสดงในรูปที่ 1 (B) ที่พบบ่อยในกาแฟ ซึ่งโครงสร้างเป็น ester ของ quinic acid เรียกว่า chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)

(A)



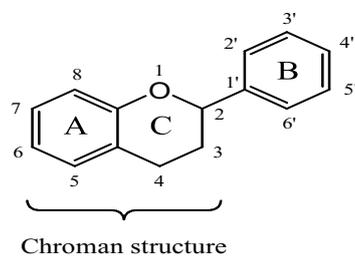
(B)



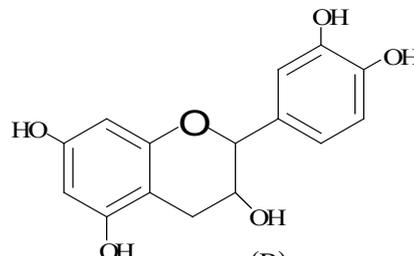
รูปที่ 1 โครงสร้างของ (A) cinnamic acid (B) caffeic acid

Flavonoid พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช flavonoids จัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอล มีสูตรโครงหลักเป็นฟลาเวน (flavan) หรือ 2-ฟีนิลเบนโซไพแรน 2 วง จับกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งอาจจัดเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 ทำให้โครงสร้างหลักที่ได้เหมือนโครงสร้างหลักของวิตามินอี ที่เป็นโครงสร้างแบบ chroman หรือ benzopyran ดังแสดงในรูปที่ 2 (A) และตัวอย่างของสารกลุ่ม flavonoid แสดงดังรูปที่ 2 (B)

(A)



Chroman structure



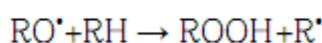
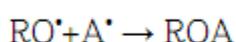
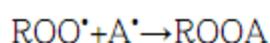
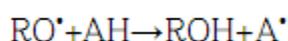
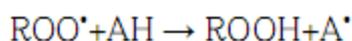
(B)

รูปที่ 2 โครงสร้างของ (A) ฟลาเวน (B) (+)-catechin

**คุณสมบัติของ polyphenol** นอกจากจะเป็นสารที่ทำให้ดอกหรือผลมีสีสวย เช่น สีเหลือง ชมพู แดง ฟ้า หรือม่วง ซึ่งมีประโยชน์ใช้ล่อแมลง นก หรือผึ้งเข้ามาผสมเกสร เพื่อแพร่กระจายพันธุ์แล้ว มีรายงานการศึกษามากมายยืนยันถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ใช้ในการป้องกันและอักเสบต้านการแพ้ ต้านไวรัส เป็นต้น ซึ่งพบว่า คุณสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันของ polyphenol กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ รวมถึงกลุ่ม polyphenol อื่นๆ มี 3 กลไก ดังต่อไปนี้ [3]

1. เป็นสารคีเลต (chelating agent) ทำหน้าที่จับหรือฟอร์มพันธะโคออร์ดิเนตกับโลหะหนัก เช่น ทองแดง และ เหล็ก ซึ่งมีบทบาทสำคัญการกระตุ้นการสร้าง รวมทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ

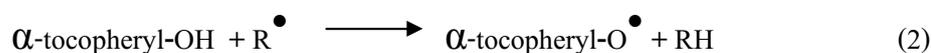
2. เป็นสารต้านออกซิเดชันจากการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking) ของ lipid alkoxyl และ peroxy radicals โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น ดังแสดงในปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



(1)

เมื่อ AH = phenolic compound,  $\text{RO}^\bullet$  และ  $\text{ROO}^\bullet$  = อนุมูลอิสระในร่างกาย และ

3. ทำหน้าที่ regenerate วิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) โดยจะรีดิวส์อนุมูล  $\alpha$ -tocopheroxyl กลับเป็น  $\alpha$ -tocopherol เหมือนเดิม ทำให้สามารถทำหน้าที่เป็น antioxidant ได้ต่อไป ดังแสดงในสมการ (2) และ (3)



### 1.3 ข้อมูลทั่วไปของขิง [4]

ขิงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Zingiber officinale* Roscoe อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อสามัญคือ Ginger มีชื่อตามท้องถิ่น ขิงแกลง, ขิงแดง (จันทบุรี), ขิงเผือก (เชียงใหม่), สะเอ (แม่ฮ่องสอน), ขิงบ้าน, ขิงแครง, ขิงป่า, ขิงเขา, ขิงดอกเดียว (ภาคกลาง), เกีย (จีนแต้จิ๋ว)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ขิงนั้น ขิงเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน สูงประมาณ 1 เมตร ใบรูปพาย กาบใบยาวหุ้มลำต้น ดอกเล็ก ๆ เป็นช่อทรงกระบอก ตั้งออกจากเหง้าใต้ดิน กาบสีแดง กลีบสีเหลืองอมเขียว ผลกลม นิยมปลูกไว้ปรุงอาหาร ขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อ รูปของขิงแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลักษณะของต้นจิงและเหง้าจิง

ข้อมูลสรรพคุณและการนำไปใช้เป็นยาสมุนไพร [5, 6]

เหง้า: รสหวานเผ็ดร้อน ขับลม แก้ท้องอืด จุกเสียด แน่นเฟ้อ คลื่นไส้อาเจียน แก้หอบไอ ขับเสมหะ แก้บิด เจริญอากาศธาตุ สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย จะออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ ใช้เหง้าแก่ทุบหรือบดเป็นผง ชงน้ำดื่ม แก้อาการคลื่นไส้อาเจียน แก้จุกเสียด แน่นเฟ้อ เหง้าสด ตำคั้นเอาน้ำผสมกับน้ำมะนาว เดิมเกลือเล็กน้อย จิบแก้ไอ ขับเสมหะ ข้อควรระวัง: น้ำจิงที่เข้มข้นมากๆ จะออกฤทธิ์ตรงข้ามกัน คือระงับการบีบตัวของลำไส้ ควรใช้ในปริมาณที่พอดี

ต้น: รสเผ็ดร้อน ขับลมให้ผายเรอ แก้จุกเสียด แก้ท้องร่วง

ใบ: รสเผ็ดร้อน แก้ฟกช้ำ แก้น้ำ แก้ขัดปัสสาวะ แก้โรคตา ฆ่าพยาธิ

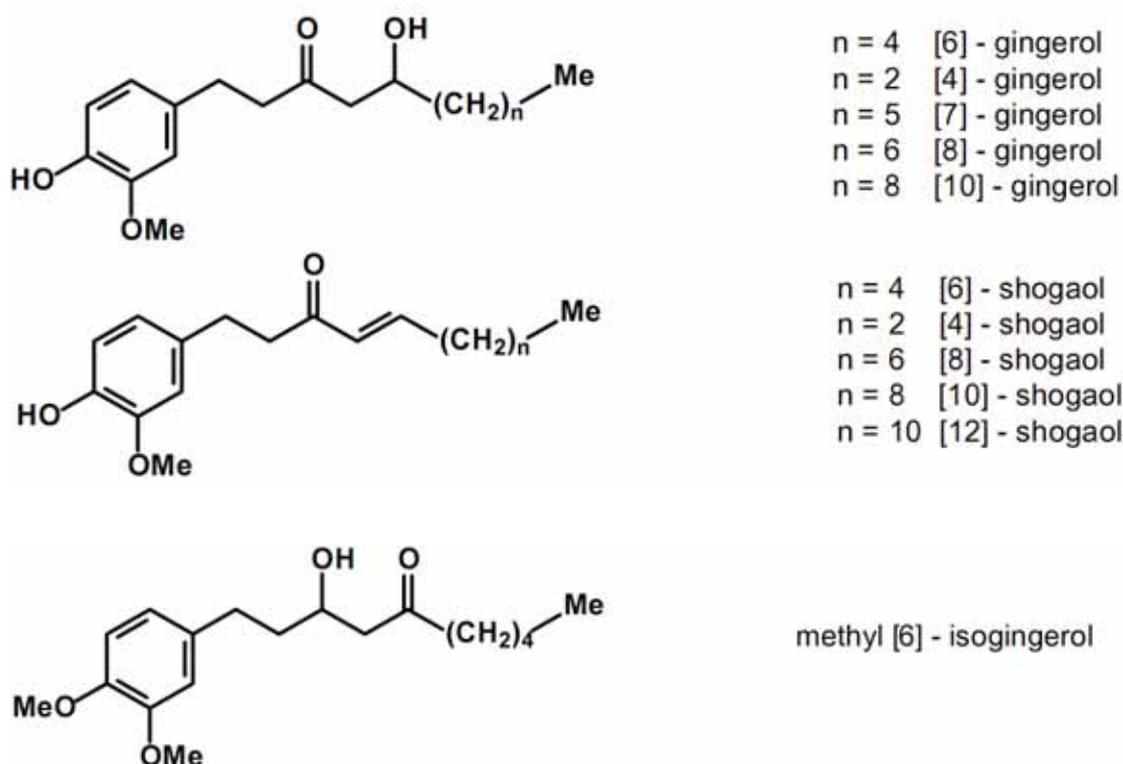
ดอก: รสเผ็ดร้อน แก้โรคประสาทซึ่งทำให้ใจขุนมัว ช่วยย่อยอาหาร แก้ขัดปัสสาวะ

ราก: รสหวานเผ็ดร้อนขม แก้แน่น แก้เสมหะ เจริญอาหาร แก้ลม แก้เสมหะ แก้บิด บำรุงเสียงให้เพราะ

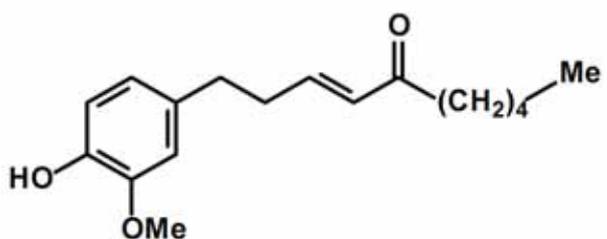
ผล: รสหวานเผ็ด บำรุงน้ำนม แก้ไข้ แก้คอแห้ง เจ็บคอ แก้ตาฟาง เป็นยาอายุวัฒนะ

### 1.3.1 องค์ประกอบทางเคมีในขิง

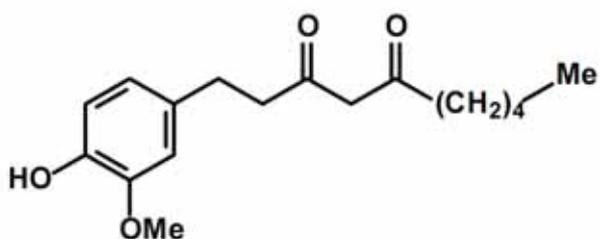
Ali และคณะ [7] รายงานว่าส่วนประกอบทางเคมีของขิงจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดและประเภทของขิงว่าเป็นขิงสดหรือว่าขิงแห้ง โดยกลิ่นฉุนและรสเผ็ดของขิงนั้น เกิดขึ้นจาก volatile oil องค์ประกอบส่วนใหญ่คือ monoterpenoids ( $\beta$ -phellandrene, (+)-camphene, cineole geraniol, curcumene, citral, terpineol, borneol) และ sesquiterpenoids ( $\alpha$ -zingiberene (30-70%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (15-20%),  $\beta$ -bisabolene (10-15%), (*E-E*)- $\alpha$ -farnesene, arcurcumene, zingiberol) และสำหรับส่วนที่เป็น non-volatiles มีองค์ประกอบส่วนใหญ่คือ gingerols, shogaols และ paradols ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งสารเหล่านี้จะให้ความรู้สึกลึกเผ็ดร้อน gingerols มีหลายชนิดได้แก่ 6-, 8- และ 10 gingerol โดยจะมีอยู่ประมาณ 75, 8 และ 11% ตามลำดับและพบมากในขิงสด [8, 9] สาร gingerols จะเปลี่ยนเป็น shogaols เมื่อเกิดการสูญเสียน้ำ ซึ่งเกิดจากการเก็บรักษาและกระบวนการผ่านความร้อนของขิงสด [10] ดังแสดงในรูปที่ 5



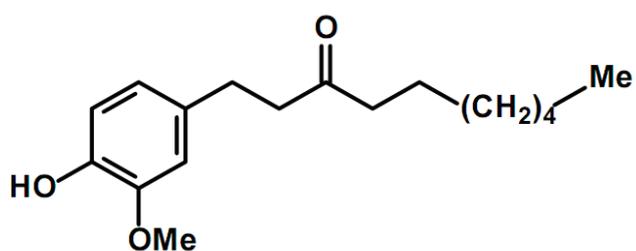
รูปที่ 4 องค์ประกอบหลักของขิง



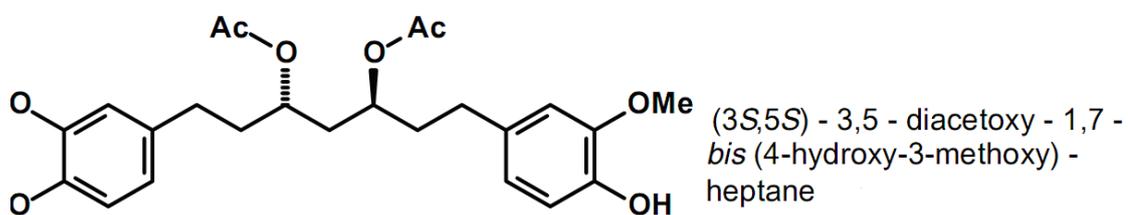
[6] - isoshogaol



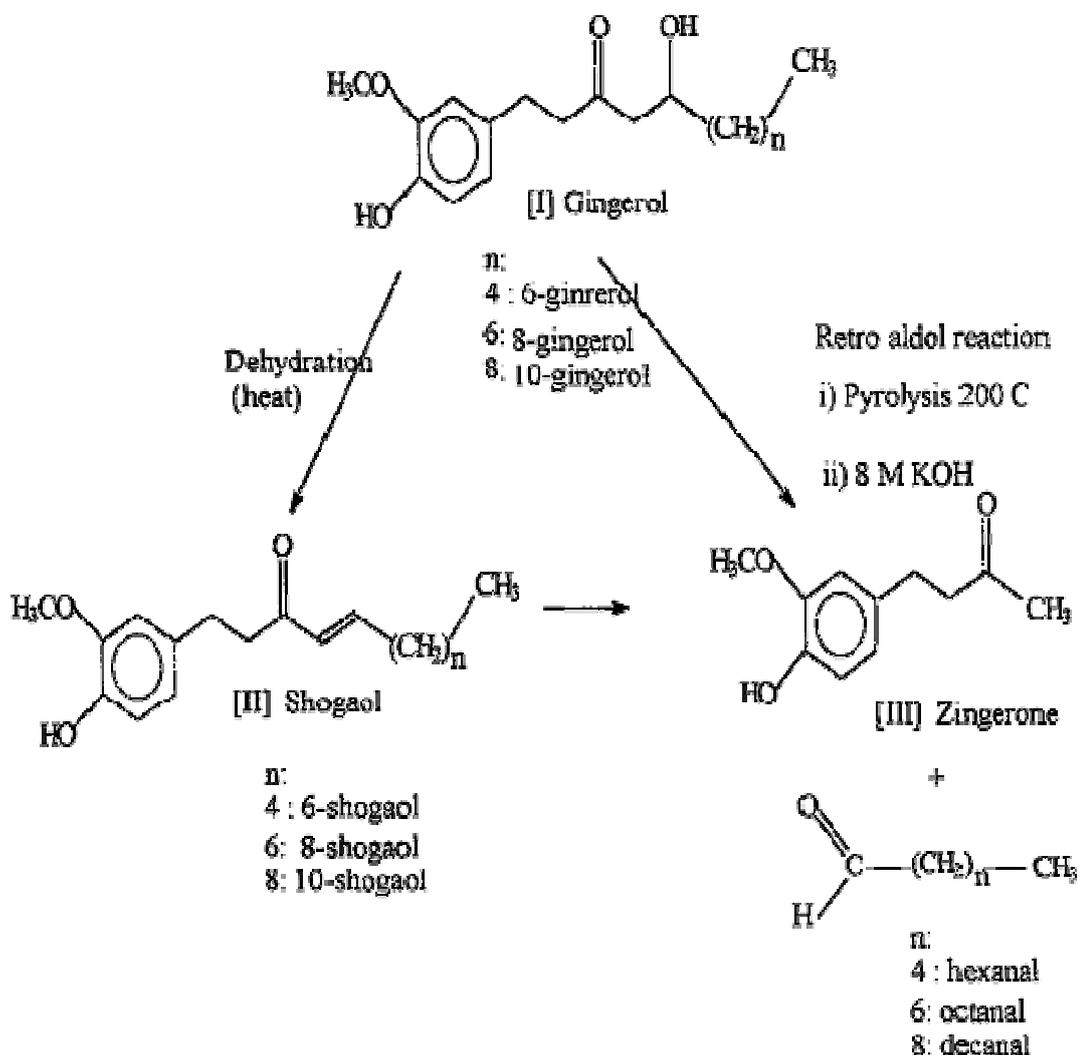
[6] - gingerdione



[6] - paradol

(3*S*,5*S*) - 3,5 - diacetoxy - 1,7 -  
bis (4-hydroxy-3-methoxy) -  
heptane

รูปที่ 4 (ต่อ) องค์ประกอบหลักของขิง



รูปที่ 5 โครงสร้างและความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบหลักของขิง

### 1.3.2 ตัวอย่างงานวิจัยที่วิเคราะห์ antioxidant activity ในตัวอย่างขิง

ค.ศ. 2000 Mansour และคณะ [11] ได้ศึกษา antioxidant activity ของ freeze-dried extracts ของเปลือกมันฝรั่ง fenugreek seed และขิง โดยการวัดปริมาณ lipid oxidation ด้วยเทคนิค spectrophotometry พบว่าสารสกัดจากขิงและถั่วมี antioxidant activity มากกว่ามันฝรั่ง โดยศึกษาผลของ pH ต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันพบว่าขิงและถั่วมี antioxidant activity มากที่สุดที่ pH 7.0 และลดลงเมื่อ pH มากขึ้น และมันฝรั่งมี antioxidant activity มากที่สุดที่ pH 5-6 และลดลงเมื่อ pH มากขึ้นและยังศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่าขิง

มี antioxidant activity ลดลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 °C และสำหรับ fenugreek seed และมันฝรั่งนั้น มี antioxidant activity ลดลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 80 °C

ค.ศ. 2003 Yizhong และคณะ [12] ได้ศึกษาพืชที่เป็นสมุนไพรในยาจีนสำหรับยับยั้งมะเร็ง เช่น จิง โดยศึกษา antioxidation activity ด้วยวิธี ABTS assay แล้วรายงานเป็น trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และวิเคราะห์ total phenolic compounds โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry พบว่าค่า TEAC และ total phenolic compounds ของสารสกัดของสมุนไพรด้วยเอทานอล มีค่าอยู่ในช่วง 46.7-17,323  $\mu\text{mol trolox equivalent}/100 \text{ g dry weight}$  และจาก 0.22-50.3 g of gallic acid equivalent/ 100 g ตามลำดับ พบว่า total phenolic compounds ส่วนใหญ่จากสมุนไพรที่ทดสอบจะเป็น phenolic acid, flavonoid, tannins, coumarins, lignans, quinines, stilbenes และ curcuminoids นอกจากนี้ยังพบว่าพืชสมุนไพรนั้นมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณของ total phenolic compounds มาก

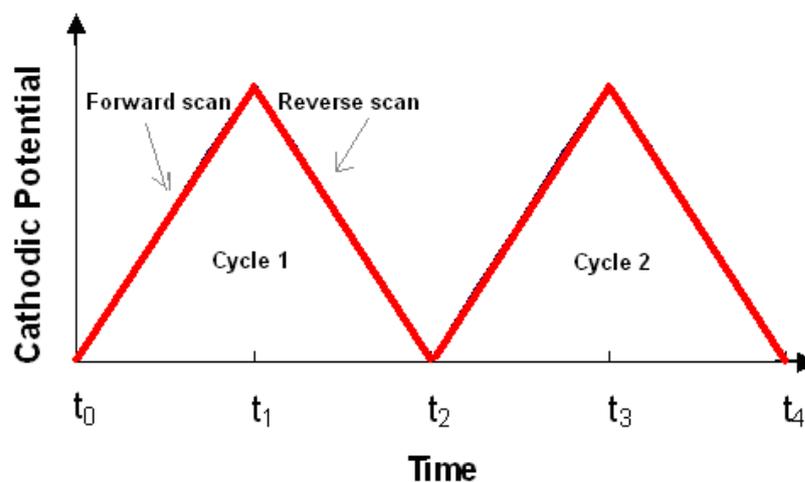
ค.ศ. 2005 Stoilova และคณะ [13] ได้ศึกษา antioxidation activity ในตัวอย่างจิงจากเวียดนาม โดยสกัดด้วย  $\text{CO}_2$  ในการวิเคราะห์ antioxidation activity มี 3 วิธีคือ DPPH assay วัดความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ใน linoleic acid model system โดยวัด conjugated dienes formation และ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และวิธีวิเคราะห์ hydroxyl radicals โดยเทคนิค deoxyribose assay วิเคราะห์ total phenolic compounds โดยเทคนิค Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดที่ได้จากจิงนั้นมี total phenolic compounds สูง เป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี มีสมบัติในการกำจัด DPPH radical และสามารถยับยั้งขั้นตอนเริ่มต้นของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยศึกษา antioxidation activity เทียบกับ butylated hydroxytoluene (BHT) ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 80 °C โดยยับยั้งในขั้นตอนการเกิดผลิตภัณฑ์อันดับที่ 2 ของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดของจิงมีคุณสมบัติในการยับยั้ง hydroxyl radical ดีกว่า quercetin ทั้งที่อุณหภูมิ 37 °C และ 80 °C

ค.ศ. 2005 Chanwitheesuk และคณะ [14] ได้ศึกษา antioxidant activity ในสมุนไพรไทยหลายชนิดเช่น จิง หน้้าหนดแมว มะขาม คื่นฉ่าย ผักเชียงดา ชะพลู สะระแหน่ เป็นต้น โดยเทคนิค  $\beta$ -carotene bleaching method พบว่า สมุนไพรเหล่านี้เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันที่ดี โดย ผักเชียงดา ชะพลู และ สะระแหน่ มี antioxidant activity มากที่สุดตามลำดับ โดยพบว่าสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสมุนไพร เช่น vitamin C, vitamin E, total carotenes, total xanthophylls, tannins และ total phenolics มีความสัมพันธ์กับ antioxidant activity

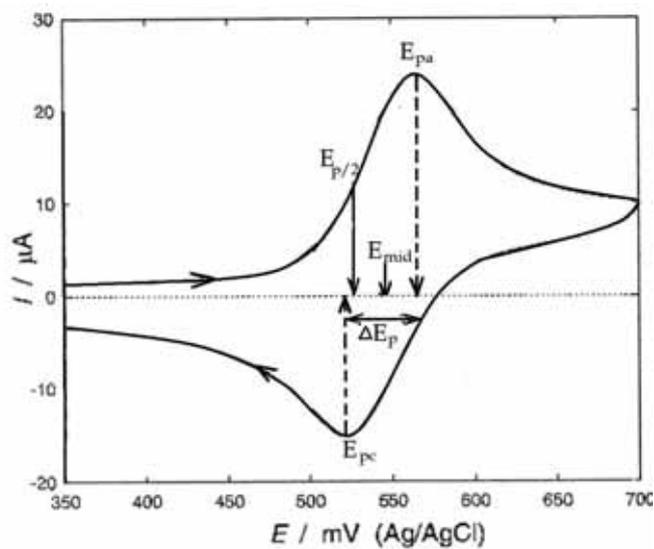
## 1.4 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันโดย voltammetry

### 1.4.1 Cyclic voltammetry (CV) [15]

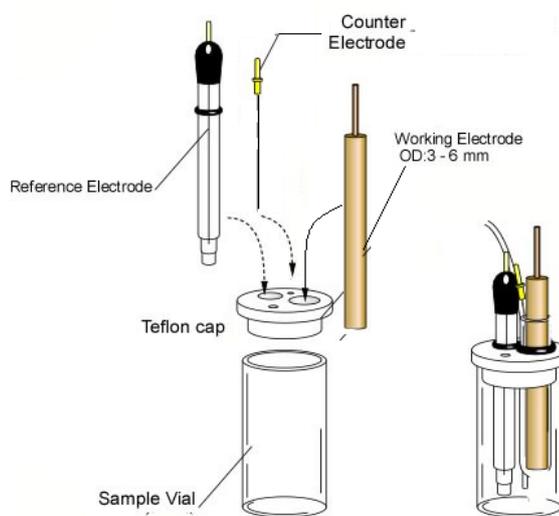
Cyclic voltammetry (CV) เป็นเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่มีโปรแกรมการให้ศักย์ไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมหน้าจั่ว ดังรูปที่ 6 ในการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วใช้งาน นั้นจะให้ไปทั้งทางด้าน positive scan และ negative scan ด้วยอัตราเร็วที่เท่ากันเพื่อให้สารที่สนใจเกิดทั้งปฏิกิริยา oxidation และ reduction ในสารละลายที่นิ่ง โดยพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการให้ศักย์ไฟฟ้าและ cyclic voltammogram ได้แก่ initial potential ( $E_i$ ), initial sweep direction, sweep rate ( $v$ ), switching potential ( $E_\lambda$ ) และ final potential ( $E_f$ ) ลักษณะของ potential excitation signal และ response signal ซึ่งเรียกว่า cyclic voltammogram แสดงดังรูปที่ 7 และเซลล์เคมีไฟฟ้าที่ใช้ในเทคนิค CV จะประกอบด้วย 3 ขั้วคือขั้วใช้งาน (working electrode) ขั้วอ้างอิง (reference electrode) และ ขั้วช่วย (counter electrode) แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 6 Potential waveform ของ cyclic voltammetry



รูปที่ 7 Response signal voltammogram จากเทคนิค cyclic voltammetry ของปฏิกิริยาที่ชั่วใช้งานแบบผันกลับได้



รูปที่ 8 เซลล์เคมีไฟฟ้าของเทคนิค cyclic voltammetry

กลไกของปฏิกิริยาที่ชั่วไฟฟ้า และตัวแปรต่างๆ ในการทดลองจะเป็นตัวกำหนดลักษณะของ cyclic voltammogram ตัวแปรที่สำคัญในการทดลอง

- Initial potential,  $E_i$
- Initial sweep direction

- Sweep rate,  $v = \frac{dE}{dt}$
- Switching potential,  $E_\lambda$
- Final potential,  $E_f$

ความสัมพันธ์ระหว่างศักย์ไฟฟ้ากับ scan rate,  $v$  :

$$\begin{aligned} \text{ที่ } 0 < t < \lambda & \quad E = E_i - vt \\ t \geq \lambda & \quad E = E_i - 2vt + vt \end{aligned} \quad (4)$$

เมื่อ  $\lambda$  คือเวลาที่เปลี่ยน E จาก forward scan ไปเป็น reverse scan กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ประกอบด้วย

$$I = I_f + I_c \quad (5)$$

$$= I_f + AC_d \frac{dE}{dt} = I_f + AC_d v \quad (6)$$

เมื่อ  $I_f$  คือ faradaic current  $\propto v^{1/2}$  และ  $I_c$  คือ charging current  $\propto v$

ที่ scan rate ( $v$ ) สูงๆ จะทำให้  $I_c$  สูงไปด้วย ( $I_c \propto v$ ) ถ้าต้องการ faradaic current ที่ถูก จะต้องมีการหักลบ charging current ออก

สำหรับปฏิกิริยาแบบผันกลับได้  $O + ne \rightleftharpoons R$  ที่เกิดขึ้นบนขั้วซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นเรียบและกระแสไฟฟ้าถูกควบคุมโดยการแพร่ (diffusion) และปฏิกิริยาเกิดได้เร็วมาก ความสัมพันธ์ของกระแสไฟฟ้ากับเทอมต่างๆ จะมีค่าเป็นไปตามสมการ

$$i = nFAC_0 (\pi D_0 \sigma)^{1/2} \chi(\sigma t) \quad (7)$$

เมื่อ  $A$  = พื้นที่ผิวอิเล็กโทรด,  $C_0$  = ความเข้มข้นตั้งต้นของสารที่เกิดปฏิกิริยา

$D_0$  = diffusion coefficient ของสารที่เกิดปฏิกิริยา (subscript O หรือ P จะใช้ระบุว่าเทอมนั้นเป็น oxidized form หรือ reduced form)

$$\text{โดยที่} \quad \sigma = \left( \frac{nF}{RT} \right) v \quad (8)$$

$$\text{และ} \quad \sigma t = \left( \frac{nF}{RT} \right) \times (E_i - E) \quad (9)$$

จากสมการที่ (5)

$$\begin{aligned} i/nFAC_0 (D_0 \sigma)^{1/2} &= \pi^{1/2} \chi(\sigma t) \\ &= \text{Current function} \end{aligned}$$

จากสมการที่ (7)-(9) สามารถเขียนเป็นสมการของ Randles-Sevcik [15] เป็น

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (10)$$

เมื่อ  $n$  = the number of moles of electrons transferred in the reaction

$A$  = the area of the electrode ( $\text{cm}^2$ )

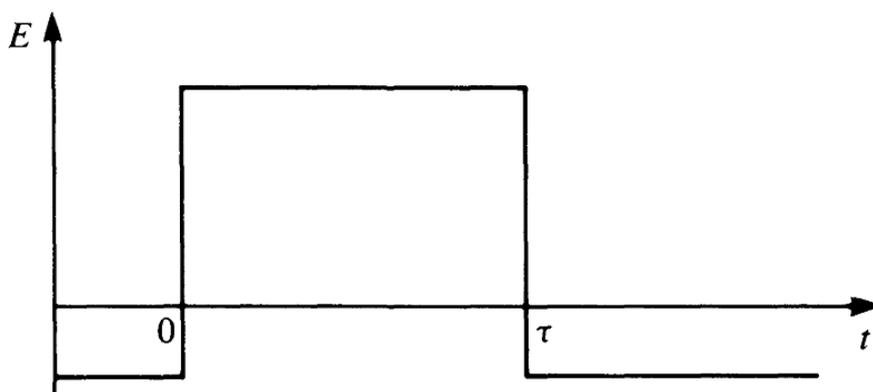
$v$  = scan rate ( $\text{Vs}^{-1}$ )

ลักษณะสำคัญของ cyclic voltammogram ที่แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วผันกลับได้ มีดังต่อไปนี้

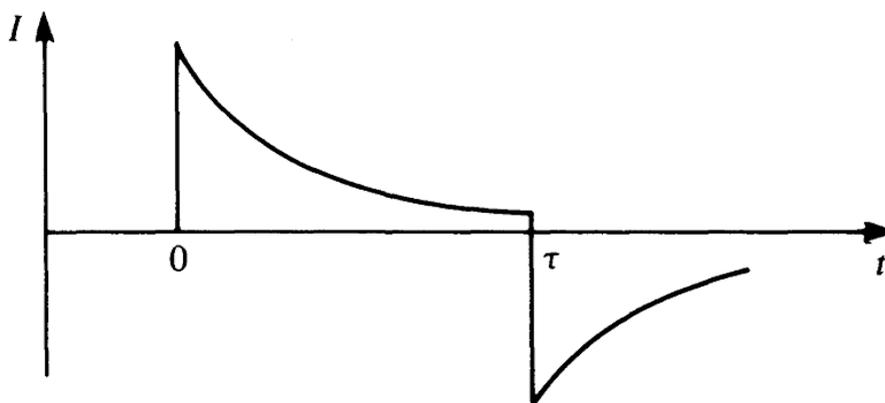
- $i_{pa} \propto v^{1/2}$
- $E_p$  ไม่ขึ้นกับ scan rate
- $|E_p - E_{p/2}| = \frac{56.6}{n} \text{mv}$
- $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{57.0}{n} \text{mv}$
- $\left| \frac{i_{pa}}{i_{pc}} \right| = 1$

#### 1.4.2 Chronoamperometry [16]

Amperometry จัดเป็นส่วนหนึ่งของ voltammetry โดยมี การให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่ขั้วใช้ และวัดกระแสไฟฟ้า เมื่อเกิดปฏิกิริยาผ่านอิเล็กตรอนที่ขั้ว ในขณะที่ Chronoamperometry เป็นการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่ขั้วใช้งาน พร้อมกับวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลา โดยส่วนใหญ่มักใช้ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้วเช่นเดียวกับเทคนิค cyclic voltammetry ลักษณะของ potential excitation แสดงดังรูปที่ 9 และ chronoamperogram แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 9 Potential excitation signal ของ chronoamperometry



รูปที่ 10 Response signal (chronoamperogram) ของเทคนิค chronoamperometry

#### 1.4.3 การตรวจสอบสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี Voltammetry

เทคนิค voltammetry เช่น square wave voltammetry [17, 18], cyclic voltammetry [9, 19, 20, 21], differential pulse voltammetry [21] และ amperometry [22] เป็นต้น ได้ถูกนำมาใช้ในการหา antioxidant capacity ของสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากพืชและน้ำผลไม้และอื่น โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างกระแสกับศักย์ไฟฟ้า โดยการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ขั้วทำงาน (working electrode) ขนาดเล็กที่มีพื้นที่ผิวเป็นตารางมิลลิเมตร และปราศจากการคนสารละลาย จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระแสขึ้นเนื่องจากเกิดโพลาไรเซชัน (polarization) ที่ขั้วทำงานขนาดเล็กนั้น กระแสที่เกิดขึ้นนี้จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น ตำแหน่งของ peak จากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นตำแหน่งของค่ากระแสไฟฟ้าซึ่งถูกจำกัดด้วยการแพร่ diffusion limited สาร antioxidant ที่จะเป็น reducing agent ที่ดีนั้นจะเกิดออกซิเดชันที่ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้าต่ำ โดยลำดับของค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดออกซิเดชัน (oxidation potential) สามารถใช้เปรียบเทียบ antioxidant capacity ของสารต่างชนิดกันได้

Kilmartin (2001) [19] เสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยา oxidation ที่ inert electrode ของ phenolic antioxidant โดยทั่วไปว่าเป็นไปตามสมการที่ 11



เมื่อ R คือ reductant (antioxidant)

O คือ product of oxidation, ซึ่งก็คือกลายเป็น oxidant

ความเข้มข้นของ R และ O ขึ้นกับค่าศักย์ไฟฟ้าและ pH โดยมีความสัมพันธ์เป็นไปตามสมการ Nernst equation ( $n = 2$ ) ดังนี้

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{(R)}{(O)(H^+)^2}$$

$$E = E^\circ - 59\text{pH} - \frac{59}{2} \log \frac{(R)}{(O)}$$

$$= E^{\circ'} - 29 \log \frac{[R]}{[O]}$$

(12)

(R) และ (O) = activities ของ reduced form และ oxidized form

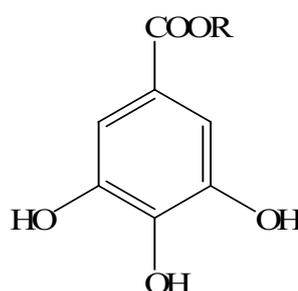
[R] และ [O] = ความเข้มข้นของ reduce form และ oxidized form

$n$  = จำนวนอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา,  $R = 8.314 \text{ J/mol K}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ,  $F = 96,487 \text{ C/mol}$

$E^{\circ'}$  = formal potential ซึ่งหาได้จาก  $(E_{pa} + E_{p/2})/2$  ของ cyclic voltammogram เมื่อ  $E_{pa}$  = anodic peak potential,  $E_{p/2}$  = half-peak potential

#### 1.4.4 พฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของ gallic acid

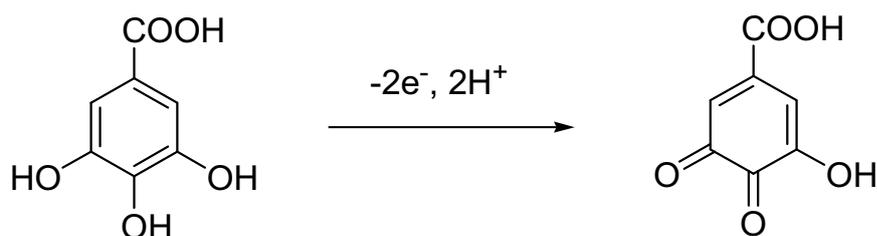
ค.ศ. 1998 Gunckel และคณะ [23] ศึกษาสมบัติทางไฟฟ้าเคมีของ gallic acid และอนุพันธ์ต่างๆของมัน (โครงสร้างดังรูปที่ 11) ในตัวกลางที่เป็นน้ำ โดยใช้ขั้วใช้งาน glassy carbon กับใช้เทคนิค cyclic voltammetry และ hydrodynamic voltammetry พบว่า gallic acid และอนุพันธ์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกรดและกลาง โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดผ่านการเสียอิเล็กตรอน 2 ขั้นตอน โดยกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นถูกควบคุมด้วยการแพร่และเป็นแบบผันกลับไม่ได้ ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้นขึ้นกับค่า pH โดยพบว่าที่ pH 2 เป็นสถานะที่ gallic acid และอนุพันธ์แสดงความสามารถในการเกิด oxidation ได้ดีที่สุด



R	Derivative
H	Gallic acid
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Propyl gallate
$\begin{array}{c} \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$	Isopropyl gallate
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Butyl gallate
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2\text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Isobutyl gallate
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Pentyl gallate
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Isopentyl gallate

รูปที่ 11 โครงสร้างของ gallic acid และอนุพันธ์ในการศึกษาของ Gunckel และคณะ [24]

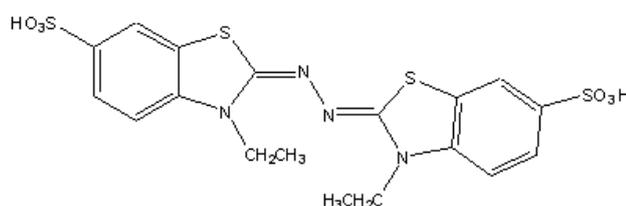
ในปี ค.ศ. 2003 Mu และคณะ [24] ได้ศึกษาปฏิกิริยา oxidation ที่ขั้ว polyaniline film ของ gallic acid โดยใช้เทคนิค cyclic voltammetry ใน 0.2 M phosphate buffer pH 5.0 -6.6 พบว่าปฏิกิริยา oxidation ที่ขั้วเกิดจาก hydroxyl ทั้งสองที่ต่อกับ double bond ของ gallic acid แสดงดังปฏิกิริยา 13 ซึ่ง  $E_{pa}$  จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ gallic acid สูงขึ้น และจะมีค่าลดลงเมื่อ pH ของสารละลายลดลง



(13)

### 1.5 วิธี 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay : (ABTS assay) [25]

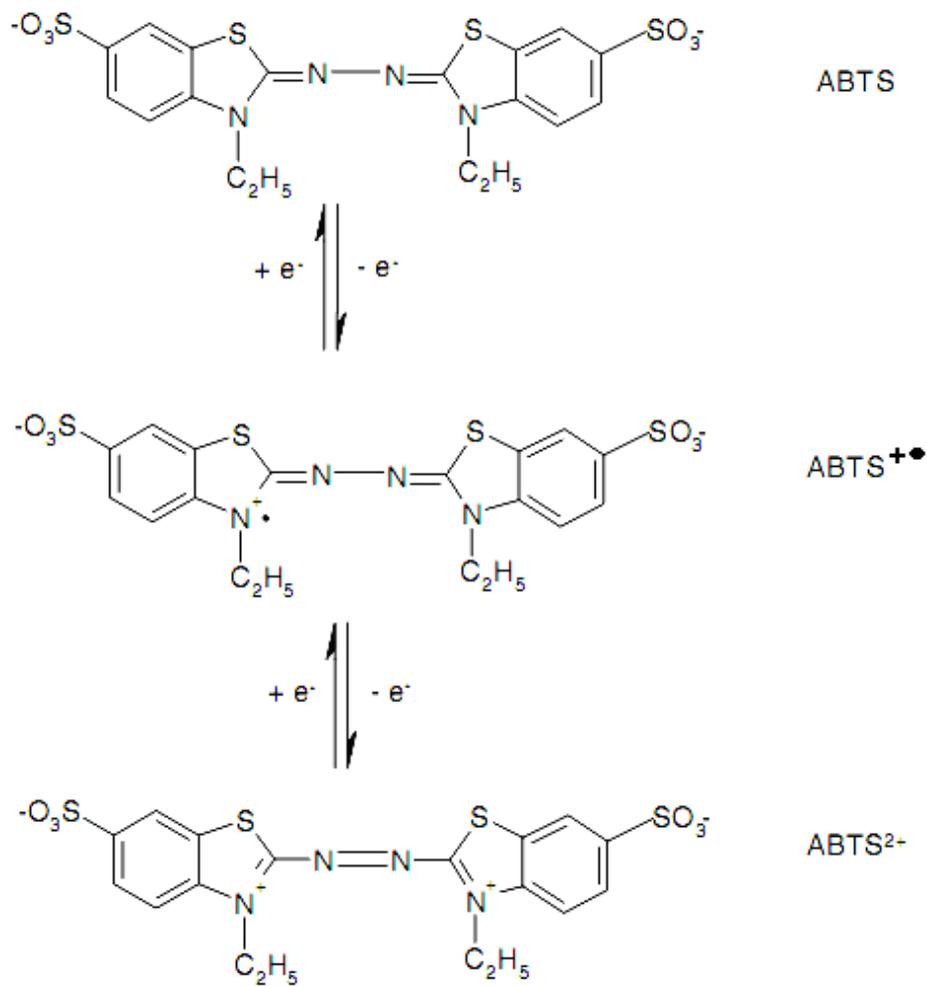
ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ซึ่งเมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายสีไม่มีสี โครงสร้างของ ABTS แสดงดังรูปที่ 12 เมื่อทำให้เกิดเป็น stable radical ในตัวทำละลายน้ำ สารละลายจะมีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 415, 648, 734, 812 nm



รูปที่ 12 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)

วิธีผลิต  $ABTS^{+\bullet}$  radical สามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ peroxidase, myoglobin เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด  $ABTS^{+\bullet}$  radical หรือใช้ปฏิกิริยาเคมีคือใช้สารเคมีเช่น manganese dioxide, potassium persulfate หรือใช้ hydrogen peroxide โดยมีเอนไซม์ peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ในปี 2004 Erel [26] ได้เสนอวิธีใหม่ในการผลิต  $ABTS^{+\bullet}$  radical โดยใช้ hydrogen peroxide ในสารละลายที่เป็นกรด การเกิด  $ABTS^{+\bullet}$  radical แสดงดังรูปที่ 13 [27]

หลักการของวิธี ABTS assay คือถ้าตัวอย่างที่นำมาทดสอบนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ ความเข้มข้นของสารละลายสีเขียวของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical จะลดลง โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) หมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical ลดลง 50% หรือรายงานผลโดยเปรียบเทียบหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานเช่น gallic acid เป็น GAE (gallic acid equivalent) หรือ trolox เป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)

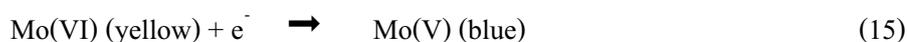


รูปที่ 13 การเกิด  $ABTS^{+•}$  radical และ  $ABTS^{2+}$  จากการเสียอิเล็กตรอนของ ABTS

ABTS assay เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์สารสกัดจากผักและผลไม้ได้ สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อยและมี reproducibility สูง ส่วนข้อเสียคือมีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียม  $ABTS^{+•}$  radical และ  $ABTS^{2+}$  radical ไม่เสถียร วิธีนี้ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน ดังนั้นค่าที่วิเคราะห์ไม่สามารถนำเทียบกับวิธีที่ทดลอง

### 1.6 วิธี Folin-Denis assay [28]

Folin-Denis Assay เป็นวิธีใช้ในการหาปริมาณ Total phenolic compounds ในสารสกัดจากพืช โดยอาศัยปฏิกิริยาของ phosphomolybdic-phosphotungstic acid (Folin – Denis reagent) ในสารละลาย  $\text{NaHCO}_3$  ได้สารเชิงซ้อนเกลือของ Mo(VI) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ phenolic compounds จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ปฏิกิริยาของ Folin – Denis reagent กับสารประกอบ phenolic compound แสดงดังปฏิกิริยา 14-15 ซึ่งเป็นปฏิกิริยา reduction ของ Mo(VI) ไปเป็น Mo(V) แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm



ได้มีการพัฒนาวิธีนี้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทต่างๆ และได้เป็นวิธีสำหรับวิเคราะห์ Total phenolic compounds โดย Association of Analytical Communities (AOAC) method

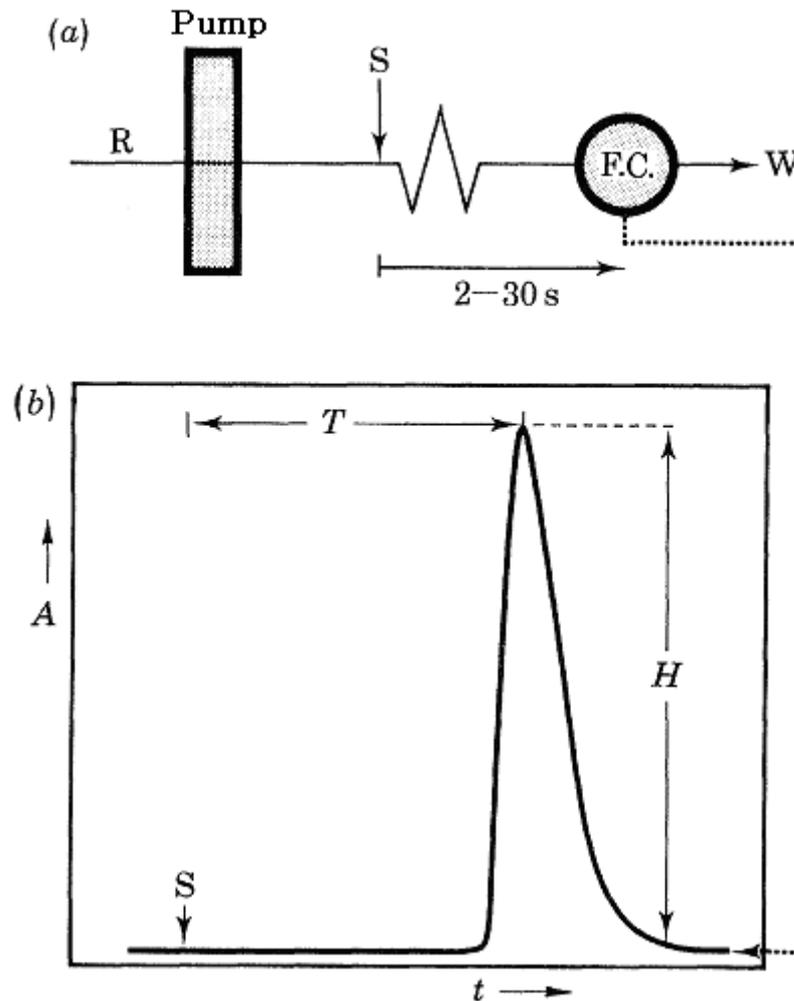
Folin-Denis assay มีข้อดี คือ ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย สะดวกรวดเร็ว และมีความแม่นยำ ส่วนข้อเสียคือวิธีนี้อาจมีการรบกวนจากสารอื่นๆ ได้ เช่น น้ำตาล, สารประกอบ aromatic, amine, sulfur dioxide และ ascorbic acid เป็นต้น

### 1.7 เทคนิค Flow injection analysis (FIA) [29]

Flow injection analysis เป็นเทคนิคการวิเคราะห์โดยตัวอย่างที่เป็นของเหลวถูกฉีดเข้าสู่กระแสของ carrier ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ dispersed sample zone ไปยัง flow cell ซึ่งมี detector ที่ทำหน้าที่บันทึกค่า absorbance, electrode potential หรือ physical parameter อื่นๆอย่างต่อเนื่อง แบบที่ง่ายที่สุดของ FIA analyzer แสดงดังรูปที่ 14(a) ประกอบด้วย pump (เช่น peristaltic pump), injection device (เช่น valve หรือ magnetic valve แบบต่างๆ), mixing coil และ flow-through detector ลักษณะสัญญาณที่ได้แสดงดังรูปที่ 14(b) ซึ่งจะมีลักษณะเป็นพีค ความสูงของพีคจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ โดยปริมาตรสารที่ใช้ต่อการวิเคราะห์หนึ่งครั้งจะอยู่ในระดับ microlitre ข้อดีของเทคนิค Flow injection analysis คือประหยัดสารเคมี, รวดเร็ว, สะดวก และสามารถใช้ร่วมกับเทคนิคต่างๆได้มากมาย ตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Detector และเทคนิคที่ใช้ร่วมกับ Flow injection analysis

Detector	Technique
Spectrophotometry	Gas diffusion
Atomic absorption Spectrophotometry	Dialysis
Inductively Coupled Plasma atomic emission	Solvent extraction
Nephelometry	Titration
Fluorescence Spectrophotometry	Reaction rate measurement by stopped flow
Chemiluminiscence	Stopped flow
Potentiometry	Merging zone
Voltammetry, polarography	Scanning methods
Conductometry	Process control and monitoring
Coulometry	



รูปที่ 14 รูปแบบของ (a) Single line flow injection analyzer, (b) Recorder output

เมื่อตำแหน่ง S = sample injection, T = residence time, H = peak height, W = waste, F.C. = flow cell และ R = reagent

เทคนิค Flow injection analysis ใช้ในงานวิเคราะห์ได้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างงานวิเคราะห์เกี่ยวกับสารต้านออกซิเดชั่น เช่น ในปี ค.ศ. 2005 Tang และคณะ [30] ใช้เทคนิค flow injection spectrofluorimetry ตรวจวิเคราะห์ hydroxyl radical หลักการคือ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย  $\text{Co}^{2+}$  ได้เป็น  $\text{HO}^\bullet$  แล้ว sodium terephthalate จับ  $\text{HO}^\bullet$  ให้กลายเป็น sodium 2-hydroxyterephthalate ด้วยปฏิกิริยา aromatic hydroxylation ผลที่ได้ทำให้ fluorescence intensity เพิ่มขึ้น ซึ่งจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ  $\text{HO}^\bullet$  จึงใช้วิธีนี้ ในการวิเคราะห์ antioxidant activity ของ natural food เช่น walnut, กระจับปี่, ขิง, พริก เป็นต้น

ในปีค.ศ. 2005 Blasco และคณะ [31] วิเคราะห์ปริมาณ total phenol ใน fresh apple, fresh pear, wines, apple/pear juices และ green beans ด้วยเทคนิค flow injection และใช้ detector เป็น electrochemical detector เปรียบเทียบกับเทคนิค Folin-Ciocalteu โดยหลักการของเทคนิคที่ Blasco และคณะ เสนอคือ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ polyphenol ที่ขั้วใช้งาน glassy carbon เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่และวัดสัญญาณกระแสที่เกิดขึ้น และรายงานปริมาณ total phenol เป็น electrochemical index โดยใช้ catechin เป็นสารมาตรฐาน

ในปีค.ศ. 2007 Milardovic และคณะ [32] วิเคราะห์ antioxidant capacity ด้วยเทคนิค electrochemical โดยใช้ interdigitated electrode (IDE) ทั้งในสารละลายที่นิ่งและในระบบ flow injection ซึ่งหลักการของวิธีนี้คือใช้เทคนิค biamperometry วัด  $ABTS^{\bullet+}$  radical/ABTS ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.4 ระหว่างการวิเคราะห์จะผลิต  $ABTS^{\bullet+}$  radical โดยเอนไซม์ peroxidase ใน tubular flow-through reactor ผลการวิเคราะห์ antioxidant capacity ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน พบว่า IDE detector นั้นมีสภาพความไวที่ดีที่  $0.3 \text{ nA}/\mu\text{M}$  ของสารมาตรฐาน Trolox และมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น  $20\text{-}500 \mu\text{M}$  ของสารมาตรฐาน Trolox

### 1.8 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีความมุ่งหมายเพื่อวิเคราะห์ antioxidant activity ของขิงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย และขิงที่สกัดด้วยน้ำ โดยวิธี cyclic voltammetry (CV) เปรียบเทียบกับวิธี ABTS radical - scavenging assay พร้อมกับวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds โดยวิธี Folin-Denis assay และทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ antioxidant activity โดยใช้เทคนิค Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD) เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ ประหยัดเวลาและสารเคมี

## บทที่ 2

### สารเคมีและเครื่องมือ

#### 2.1 เครื่องมือ / อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Autolab Eco Chemie จากประเทศเนเธอร์แลนด์รุ่น PGSTAT 30 พร้อมโปรแกรม GPES 4.9 for window version 98
2. Working electrode (ขั้วไฟฟ้าใช้ทำงาน) Glassy carbon electrode (GCE) เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm.
3. Reference electrode (ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง) Ag/AgCl electrode
4. Auxiliary electrode (ขั้วไฟฟ้าช่วย) Platinum wire electrode (Pt wire)
5. ชุดผ้าขัดพร้อมผง Alumina จากบริษัท Metrohm
6. เครื่องวัด pH (pH meter) Mettler Delta 320 พร้อมขั้ว pH glass membrane แบบ combined
7. เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียดชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo
8. Rotary evaporator BUCHI Rotavapor 114
9. Lambda 35 UV/Vis spectrometer (Perkin Elmer instrument)
10. U-3300 Spectrophotometer (HITACHI)
11. RC-5 super speed refrigerated centrifuge
12. เครื่องเขย่า (Vortex)
13. แท่นให้ความร้อน (Hot plate) พร้อมเครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) และแท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
14. Micropipettes 5-50, 50-200 และ 200-1000 L
15. ปิเปต (Measuring pipettes) และ (Volumetric pipettes) ขนาดต่างๆ
16. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาดต่างๆ
17. ขวดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาดต่างๆ
18. Thermometer 0-100 °C
19. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

20. Quartz cell คู่
21. เครื่องปั่นละเอียด Panasonic
22. ตะแกรงร่อน ขนาด 32 x 32 mesh
23. อ่างน้ำร้อน (water bath)

## 2.2 สารเคมี

ตารางที่ 3 รายชื่อสารเคมี บริษัทผู้ผลิต และเกรด

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	เกรด
2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	Fluka	puram
Acetic acid	B.D.H.	Analytical reagent
Aluminum oxide	Fluka	Puriss > 99.99%
Acetone	B.D.H.	Analytical reagent
Ascorbic acid	Aldrich	99% HPLC
Ammonia	B.D.H.	Analytical reagent
Ammonium chloride	Fluka	puram
Disodium hydrogen phosphate	Fluka	purum
Ethanol	โรงงานสุราอยุธยา	กลั่นซ้ำ 1 ครั้ง
Ethyl acetate	B.D.H.	Analytical reagent
Gallic acid-1-hydrate	SIGMA-ALDRICH	98% A.C.S. reagent
Hydrochloric acid	Merck	Pro analysis

ตารางที่ 3 (ต่อ) รายชื่อสารเคมี บริษัทผู้ผลิต และเกรด

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	เกรด
Methanol	B.D.H.	Analytical reagent
Orthophosphoric acid	B.D.H.	Analytical reagent
Phosphomolybdic acid hydrate	Riedel-deHaën	Analytical reagent
Potassium persulfate	Fluka	purum
Sodium dihydrogen phosphate	Fluka	purum
Sodium hydroxide	Fluka	purum
Sodium tungstate dihydrous	Fluka	puriss

## 2.3 การเตรียมสารละลาย

### 2.3.1 สารละลาย 50 mM acetate buffer pH 4.5

ผสมสารละลาย acetic acid 1.0 mL ใส่ในบีกเกอร์ ซึ่งมี deionized water และเติม NaOH 1.2 g จากนั้นปรับปริมาตรด้วย deionized water จนมีปริมาตร 500 mL ปรับ pH ให้ได้ 4.5 ด้วย 6 M CH<sub>3</sub>COOH หรือ 6 M NaOH

### 2.3.2 สารละลาย 50 mM phosphate buffer pH7.0

ผสมสารละลาย Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15.46 g และสารละลาย NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.90 g เข้าด้วยกันในขวดรูปกรวย (flask) ขนาด 3 L จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 3 L ด้วย deionized water ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย 6M HCl หรือ 6 M NaOH

### 2.3.3 สารละลาย 50 mM ammonium buffer pH 9.0

ผสมสารละลาย NH<sub>3</sub> 0.5 mL ใส่ในบีกเกอร์ ซึ่งมี deionized water ชั่ง NH<sub>4</sub>Cl 0.85 g ละลายใน deionized water ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันในขวดรูปกรวย (flask) จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 mL ปรับ pH ให้เป็น 9.0

## 2.4 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้คือ จิงสดที่ซื้อจากตลาดปทุมมงคล จังหวัดนครปฐม ในช่วงเดือนเมษายน ปี พ.ศ. 2551 ทำการล้างทำความสะอาด ปอกเปลือกแยกเปลือกและเนื้อ หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปั่นให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 32 x 32 mesh เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกปิดสนิท และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### บทที่ 3

#### การทดลองและผลการทดลอง

#### 3.1 การสกัดขิง

##### 3.1.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O

ชั่งตัวอย่างขิงแห้งที่ป่นละเอียด 1.00 g ใส่ลงในหลอดเติมตัวทำละลาย Acetone : Methanol : Water (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) 20 mL นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ 6000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของ supernatant ออกจาก residue นำส่วนของ residue มาทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้งปริมาตรรวม 60 mL นำ supernatant มารวมกันปรับปริมาตรสุดท้ายที่ได้เป็น 60 mL สำหรับการไปวิเคราะห์

##### 3.1.2 การสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำ

###### 1. การสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิด

ชั่งตัวอย่างเนื้อขิงแห้ง 2.500 g ใส่ในขวดรูปกรวย เดิม deionized water ปริมาตร 25 mL แล้วต้มที่อุณหภูมิ 40 °C รักษาอุณหภูมิการต้มคงที่นาน 30 นาที บน hot plate จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรองและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 25.00 mL ในขวดปริมาตรและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้อุณหภูมิในการต้มเป็น 50, 60, 70 และ 80 °C โดยทำซ้ำอุณหภูมิละ 3 ครั้ง

2. การสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำและสารระเหย (volatile compound)

ชั่งตัวอย่างเนื้อขิงแห้ง 2.500 g ใส่ในขวดรูปกรวย เดิม deionized water ปริมาตร 25 mL แล้วต้มที่อุณหภูมิ 40 °C ปิดปากขวดรูปกรวยด้วย aluminium foil รักษาอุณหภูมิการต้มคงที่นาน 30 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองและปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 25.00 mL ในขวดปริมาตรและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้อุณหภูมิในการต้มเป็น 50, 60, 70 และ 80 °C โดยทำซ้ำอุณหภูมิละ 5 ครั้ง

### 3.2 การวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันในสารสกัดจากขิง โดยเทคนิค cyclic voltammetry (CV)

การวิเคราะห์ antioxidant ในสารสกัดจากขิงโดยเทคนิค CV ใช้เครื่อง Autolab PGSTAT 30 พร้อมโปรแกรม GPES for window version 4.9 ใช้ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ดังนี้ ขั้วใช้งานเป็น glassy carbon electrode (GCE) เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm ขั้วอ้างอิงเป็น Ag/AgCl (saturated KCl) และขั้วประกอบเป็น platinum disk electrode เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm

#### 3.2.1 การเตรียมผิวขั้วใช้งาน GCE

##### วิธีการทดลอง

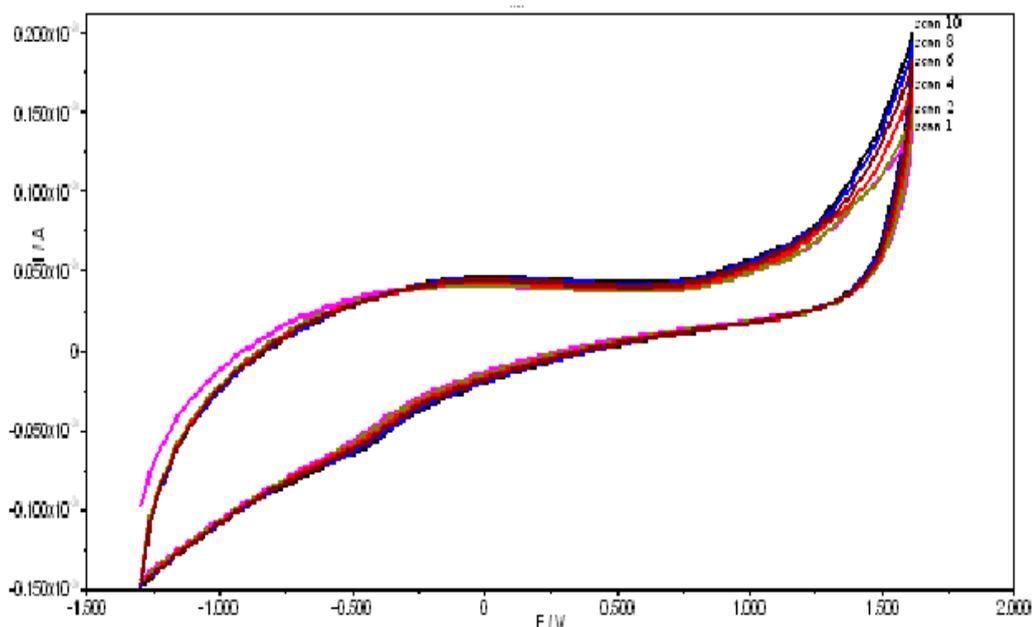
1. ขัดขั้ว GCE บนกระดาษกรองเปียก, กระดาษกรองที่มีผง alumina (ขนาดอนุภาค 1  $\mu\text{m}$ ) และผ้าขัดเปียก ตามลำดับ โดยหลังจากขัดในแต่ละขั้นตอนจะ rinse ด้วย deionized water ก่อนที่จะขัดในขั้นตอนต่อไป

2. จุ่มขั้วไฟฟ้าทั้งสามลงในสารละลาย 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  25 mL ใส่ลงในเซลล์พ่นแก๊ส nitrogen 3 นาที เพื่อไล่ oxygen

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)	:	0.2

โดยการ scan ศักย์ไฟฟ้า 10 รอบหลังจากนั้นยกขั้วทั้งสามขึ้น rinse ขั้วไฟฟ้าทั้งสามด้วย deionized water อีกครั้งจะได้ GCE ที่มีผิวขั้วพร้อมใช้งาน ลักษณะของ cyclic voltamogram ที่ได้ แสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 Cyclic voltammogram จากการทำ electrode pretreatment ขั้ว GCE โดย cycling potential ใน 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  10 รอบ

#### ผลการทดลอง

จาก cyclic voltammogram ที่ได้พบว่า cyclic voltammogram มีลักษณะที่คงที่ตั้งแต่รอบที่ 6 ขึ้นไป

#### 3.2.2 การศึกษาผลของ supporting electrolytes ที่ pH ต่างๆ ต่อ cyclic voltammogram ของสารมาตรฐาน gallic acid และ สารตัวอย่าง

##### วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งาน โดยทำ pretreatment ขั้ว GCE ตามหัวข้อ 3.2.1
2. ปิเปตสารสกัดจากขิงจากข้อ 3.1.1 ปริมาตร 2.00 mL เติมลงในสารละลาย supporting electrolyte acetate buffer pH 4.5 ปรับปริมาตรรวมเป็น 25.00 mL แล้วบันทึก cyclic voltammogram โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองดังนี้

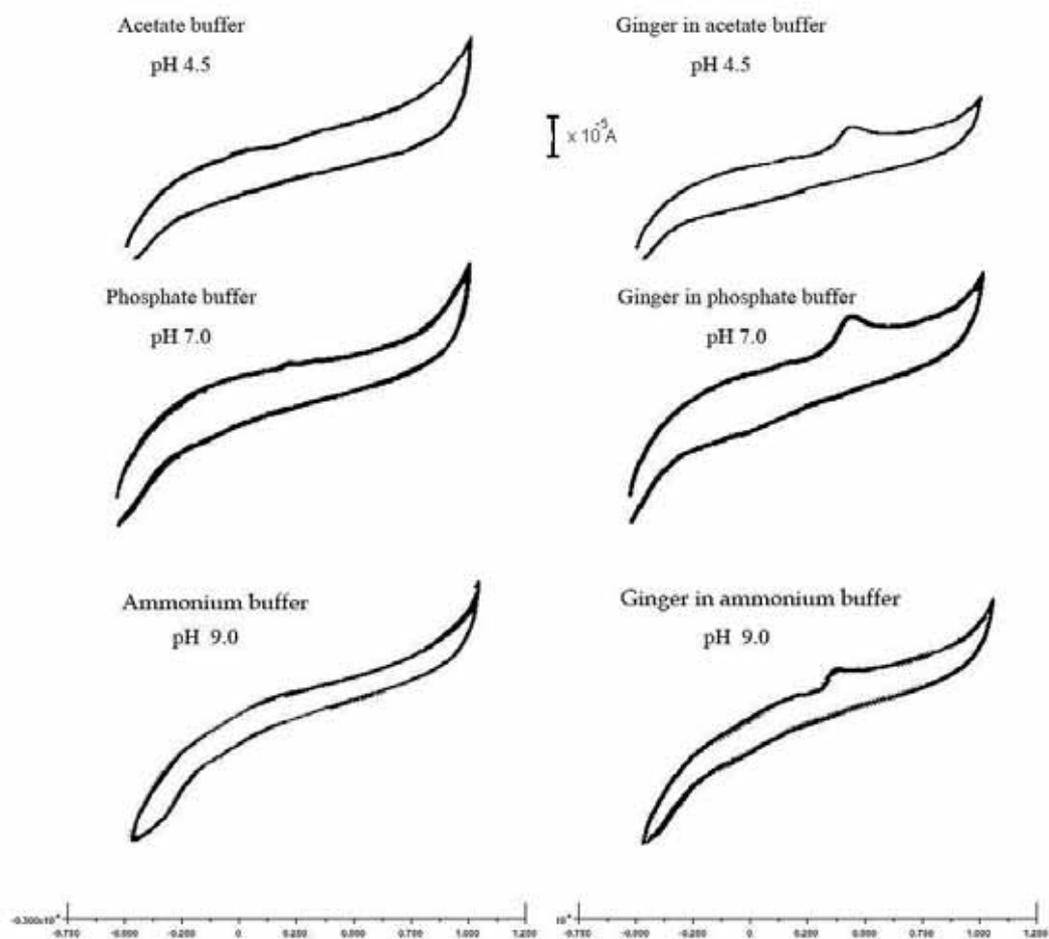
Start potential (V)	:	0
First vertex potential (V)	:	0.8
Second vertex potential (V)	:	0
Scan rate (V/s)	:	0.1

3. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 1 – 2 แต่เปลี่ยนสารละลาย supporting electrolyte เป็นสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 และ  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 9.0

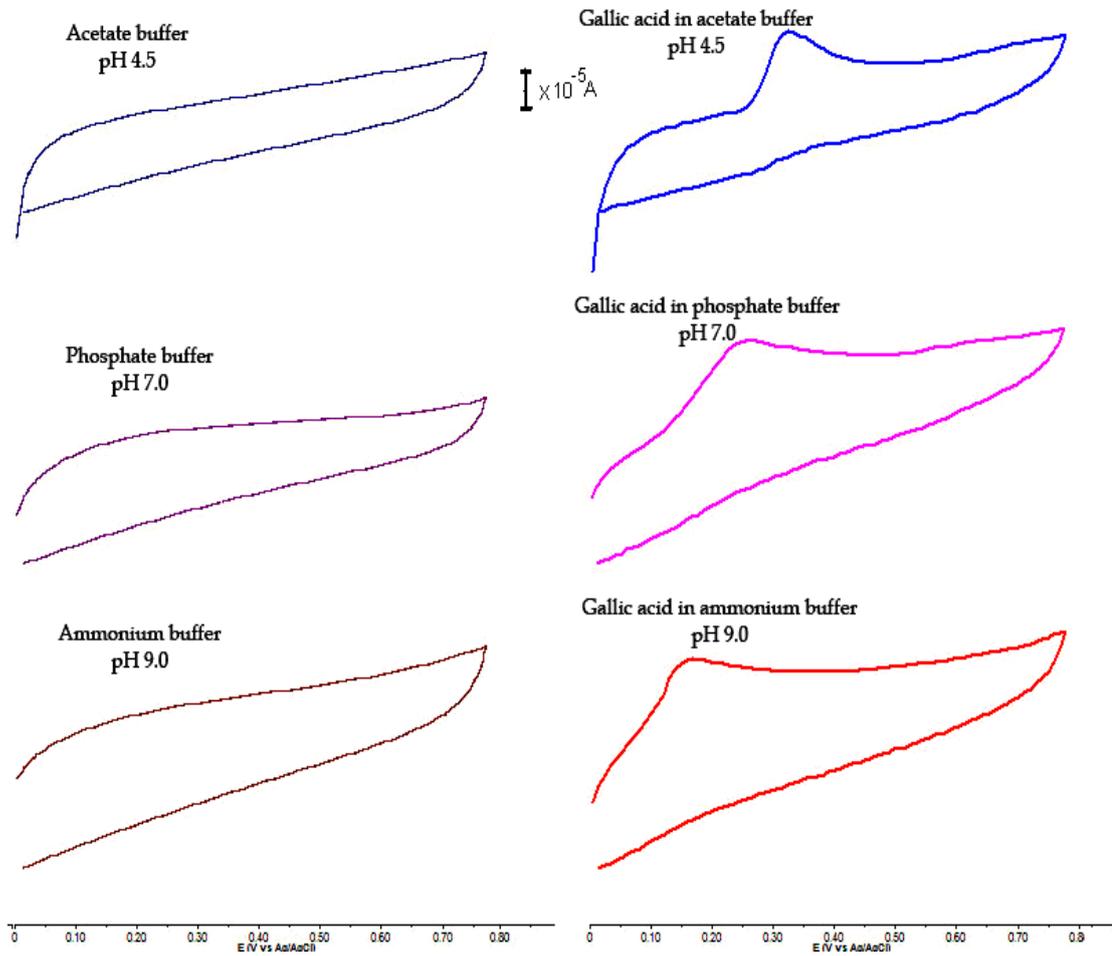
4. ใช้โปรแกรม analysis peak search รายงานค่า  $E_p$  และ  $i_p$  ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 และตารางที่ 4

5. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-4 แต่เปลี่ยนสารสกัดจากขิงเป็นสารมาตรฐาน gallic acid 0.04 mM ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 17 และตารางที่ 5

### ผลการทดลอง



รูปที่ 16 Cyclic voltammograms ของ supporting electrolyte และสารสกัดจากขิงใน acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 7.0 และ  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$  buffer pH 9.0



รูปที่ 17 Cyclic voltammograms ของ supporting electrolyte และสารมาตรฐาน gallic acid 0.04 mM ใน acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 7.0 และ NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl buffer pH 9.0

ตารางที่ 4 ค่า anodic peak potential (E<sub>pa</sub>) และ anodic peak current (i<sub>pa</sub>) ของสารตัวอย่างเข้มข้น 1.67% (w/v) ใน supporting electrolyte ต่างๆ

Supporting electrolyte	E <sub>pa</sub> (V vs Ag/AgCl)	i <sub>pa</sub> (μA)
Acetate buffer pH 4.5	0.568	3.818
Phosphate buffer pH 7.0	0.438	3.636
NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Cl buffer pH 9	0.307	2.273

ตารางที่ 5 ค่า anodic peak potential ( $E_{pa}$ ) และ anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.40 mM ใน supporting electrolyte ต่างๆ

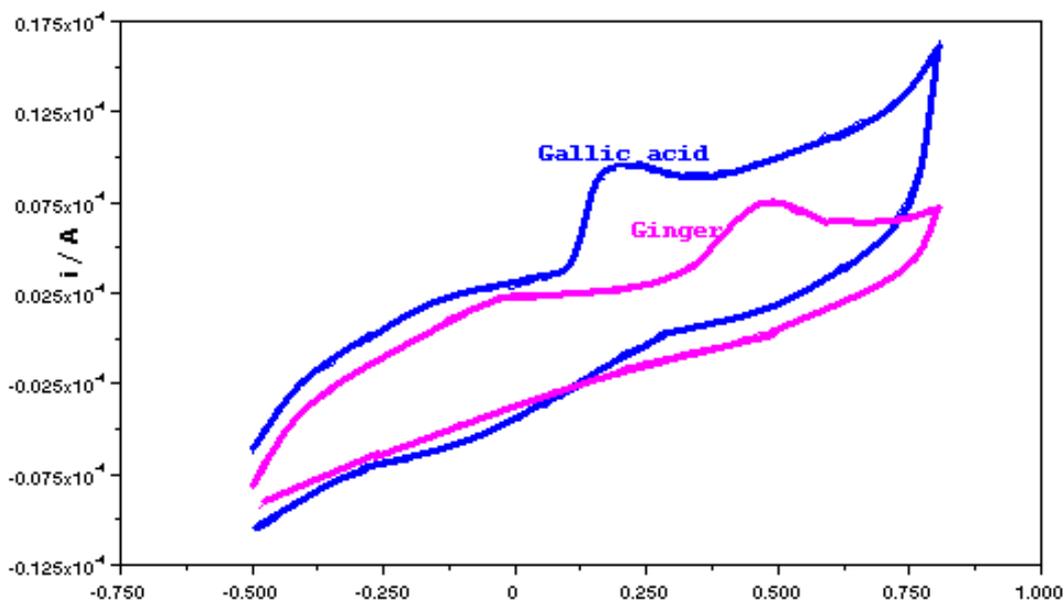
Supporting electrolyte	$E_{pa}$ (V vs Ag/AgCl)	$i_{pa}$ ( $\times 10^{-5}$ A)
Acetate buffer pH 4.5	0.332	2.037
Phosphate buffer pH 7.0	0.282	1.172
NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Cl buffer pH 9	0.161	1.409

จากรูปที่ 16 และ 17 พบว่าเมื่อ pH ของสารละลาย electrolyte สูงขึ้นค่า anodic peak potential ( $E_{pa}$ ) จะลดลงนั่นหมายความว่าเกิดการเกิดปฏิกิริยา oxidation ที่ขั้วของสารตัวอย่าง จะเกิดได้ง่ายขึ้นเป็นไปตามสมการที่เสนอโดย Kilmartin (2001)[19]

และจากการพิจารณาค่า anodic peak current ( $i_{pa}$ ) พบว่าเมื่อ pH ของสารละลาย electrolyte สูงขึ้นค่า anodic peak current ( $i_{pa}$ ) จะลดลง phosphate buffer มีสภาพเป็นกลาง และเนื่องจากไม่ต้องการให้ pH มีผลต่อ reducing capacity ของสารต้านออกซิเดชั่น จึงเลือกใช้สารละลาย phosphate buffer นี้เป็นสารละลาย supporting electrolyte สำหรับการศึกษาศักดิ์จากจิงในเทคนิค cyclic voltammetry ต่อไป

### 3.2.3 การเปรียบเทียบ voltammetric behavior ของสารสกัดจากจิงกับสารต้านออกซิเดชั่นมาตรฐาน

จากผลการทดลองคาดว่าในสารสกัดจากจิงนั้น ประกอบไปด้วยสาร antioxidant หลายตัว ในการหาปริมาณสารต้านออกซิเดชั่น ในสารสกัดจากจิงจึงเป็นการวิเคราะห์ antioxidant activity ของทั้งหมดในตัวอย่าง ทั้งนี้จะเลือกใช้ gallic acid เป็นสาร antioxidant มาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื่องจาก gallic acid นั้นเป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่พบมากในพืช ผัก และผลไม้ มีค่า anodic peak potential ( $E_{pa}$ ) เท่ากับ 0.238 V และสารตัวอย่างมีค่า  $E_{pa}$  เท่ากับ 0.438 V ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากขิงและสารมาตรฐาน gallic acid ใน phosphate buffer pH 7.0

### 3.2.4 Calibration graph ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จากเทคนิค cyclic voltammetry (CV)

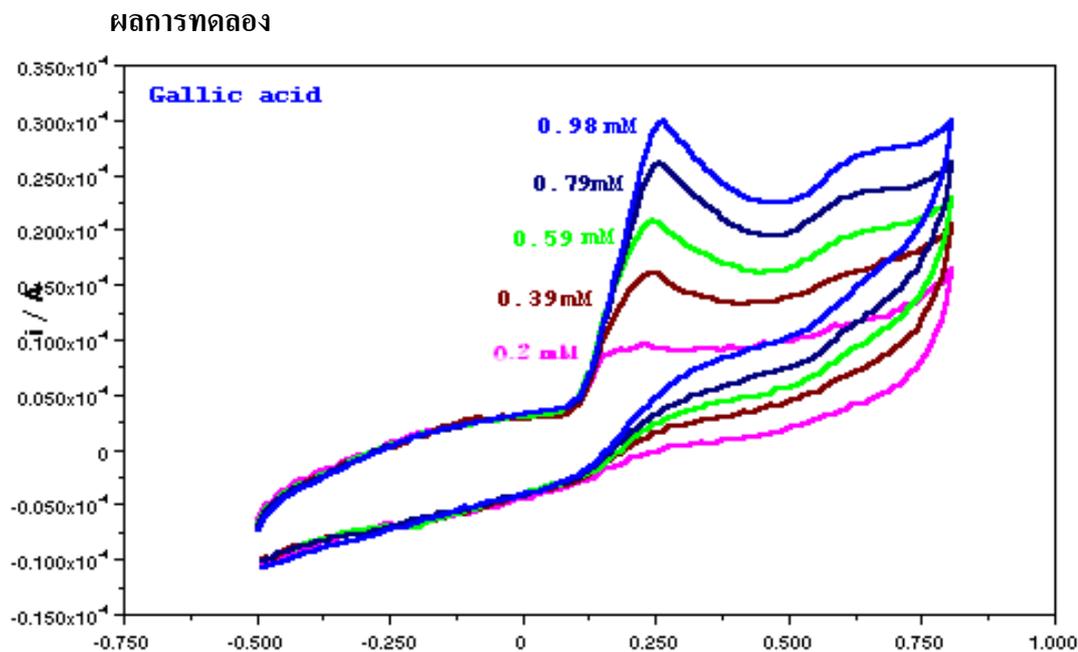
#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว GCE ตามหัวข้อ 3.2.1
2. บันทึก cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 mM ใน phosphate buffer pH 7.0 โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลอง ดังนี้

Start potential (V)	:	- 0.5
First vertex potential (V)	:	0.8
Second vertex potential (V)	:	-0.5
Scan rate (V/s)	:	0.1

3. ใช้ analysis peak search รายงานค่า anodic peak potential ( $E_{pa}$ ), anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ผลการทดลองแสดงในรูป 19 และตารางที่ 6

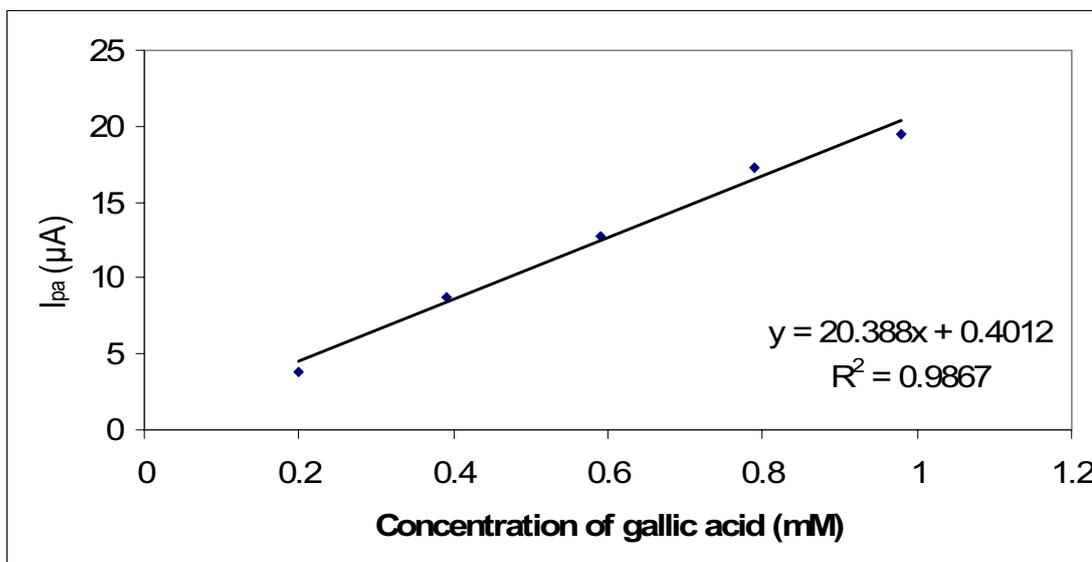
4. พล็อตค่า anodic peak current ( $i_{pa}$ ) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กราฟที่ได้แสดงดังรูป 20



รูปที่ 19 Cyclic voltammogram ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0

ตารางที่ 6 ค่า anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน phosphate buffer pH 7.0

Conc. (mM)	$i_{pa}$ ( $\mu\text{A}$ )
0.20	3.80
0.39	8.75
0.59	12.8
0.79	17.3
0.98	19.5



รูปที่ 20 พล็อตระหว่าง anodic peak current ( $i_{pa}$ ) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน phosphate buffer pH 7.0 จากเทคนิค cyclic voltammetry

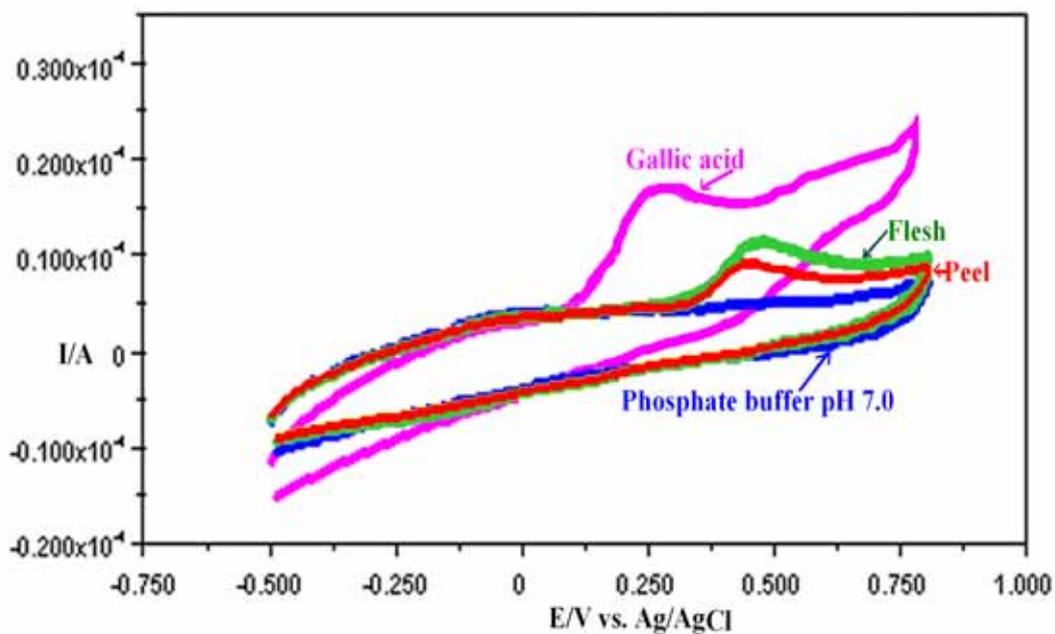
จาก calibration curve ที่พล็อตระหว่าง anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ที่ศักย์ไฟฟ้า 230 mV vs Ag/AgCl กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid พบว่า calibration curve มีสมการเส้นตรงคือ  $y = 20.388x + 0.4012$  และมี  $R^2 = 0.9867$

### 3.2.5 การวิเคราะห์ antioxidant activity ในสารสกัดจากขิงโดยเทคนิค CV

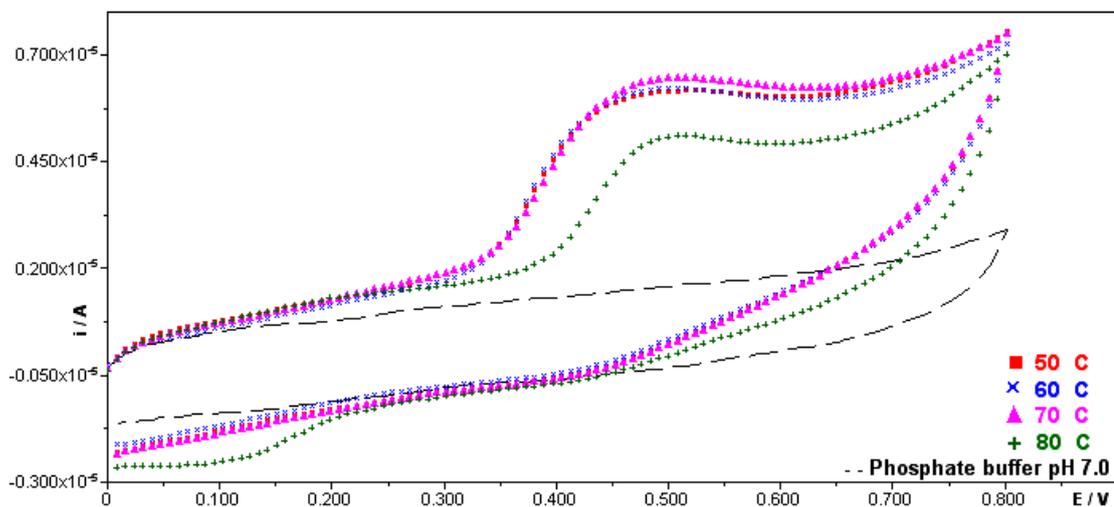
#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว GCE ตามหัวข้อ 3.2.1
2. แล้วใช้สารสกัดจากขิง จากข้อ 3.1.1-3.1.2 ปริมาตร 5.00 mL ผสมกับ phosphate buffer pH 7.0 ให้มีปริมาตรรวม 25 mL บันทึก cyclic voltammogram ของสารละลายที่เตรียมได้ โดยใช้สภาวะต่างๆของการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 21-22
3. ใช้ analysis peak search รายงานค่า anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ณ ตำแหน่ง 0.45 V vs Ag/AgCl ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 7 - 9
4. คำนวณ antioxidant activity ในสารสกัดจากขิงโดยรายงานเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg/g dried sample ค่าที่ได้แสดงดังตาราง 10 - 12

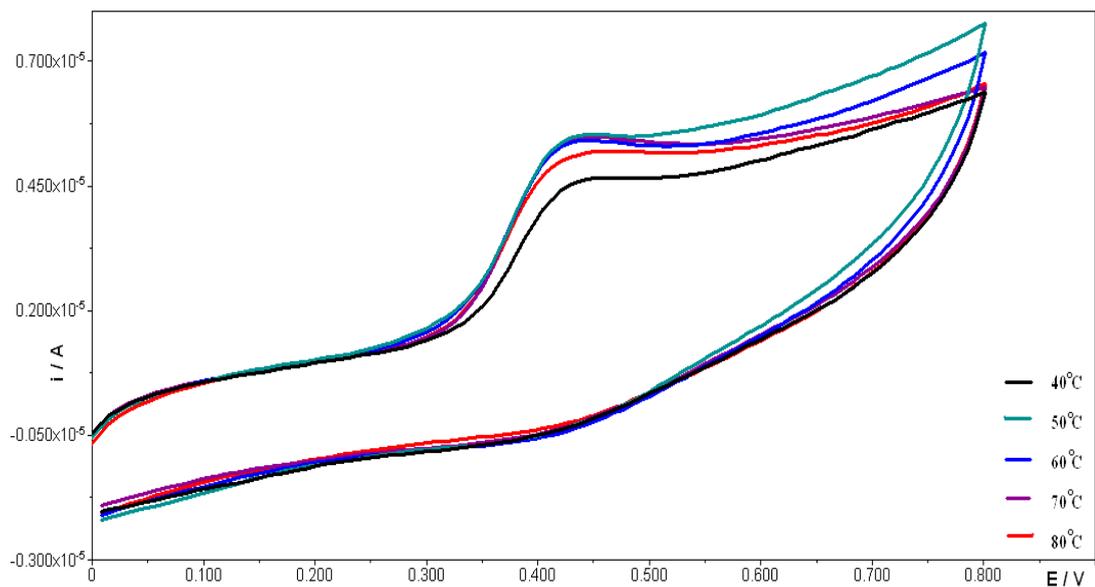
## ผลการทดลอง



รูปที่ 21 Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อจึงโดยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O



รูปที่ 22 Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ



รูปที่ 22 (ต่อ) Cyclic voltammogram ของสารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ 7 ข้อมูล anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารสกัดจากเนื้อและเปลือกจึงโดยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O (n = 3)

สารสกัดจิง	$i_{pa}$ ( $\mu\text{A}$ )		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เปลือก	4.46	4.51	4.47
เนื้อ	4.96	6.54	6.18

ตารางที่ 8 ข้อมูล anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ ( $n = 3$ )

Infusion temperature (°C)	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
40	3.60	3.40	3.05
50	2.91	2.93	2.93
60	2.64	2.77	2.58
70	2.75	2.81	2.55
80	1.81	1.82	1.80

ตารางที่ 9 ข้อมูล anodic peak current ( $i_{pa}$ ) ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ ( $n = 5$ )

Infusion temperature (°C)	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5
40	1.75	1.93	1.64	1.76	1.83
50	1.90	2.45	2.38	2.17	2.25
60	2.16	2.52	2.32	2.85	2.35
70	2.55	2.86	2.88	3.02	2.66
80	2.34	2.49	2.40	2.40	2.31

ตารางที่ 10 ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อและเปลือกชิงโดยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O ( $n = 3$ )

สารสกัดชิง	GAE (mg/g dried sample)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD
เปลือก	1.87	1.89	1.88	1.88 $\pm$ 0.01
เนื้อ	2.10	2.83	2.67	2.53 $\pm$ 0.38

ตารางที่ 11 ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ (n = 3)

Infusion temperature (°C)	GAE (mg/g dried sample)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
40	0.9479	0.7784	0.8240	0.850 ± 0.088
50	0.4456	0.6009	0.6009	0.549 ± 0.090
60	0.4186	0.6020	0.6651	0.562 ± 0.128
70	0.3892	0.5987	0.6114	0.533 ± 0.125
80	0.2116	0.2150	0.2011	0.209 ± 0.007

ตารางที่ 12 ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ (n = 5)

Infusion temperature (°C)	GAE (mg/g dried sample)					ค่าเฉลี่ย ± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	
40	0.623	0.704	0.573	0.625	0.660	0.637 ± 0.049
50	0.693	0.945	0.913	0.817	0.855	0.844 ± 0.098
60	0.811	0.978	0.886	1.128	0.900	0.941 ± 0.120
70	0.992	1.137	1.144	1.210	1.043	1.105 ± 0.087
80	0.895	0.966	0.923	0.920	0.879	0.916 ± 0.033

จากผลการทดลองเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7: 7: 6 โดยปริมาตร) ในการวิเคราะห์ antioxidant activity พบว่าในเนื้อชิงมี antioxidant activity มากกว่าในเปลือกชิง เมื่อนำเนื้อชิงมาทำการสกัดด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % พบว่าค่า antioxidant activity ที่อุณหภูมิ 40 °C > ค่า antioxidant activity ที่อุณหภูมิ 50-70 °C > ค่า antioxidant activity ที่อุณหภูมิ 80 °C แต่เมื่อนำเนื้อชิงมาทำการสกัดด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า antioxidant activity ที่ 70 °C มีค่าสูงสุดและค่า antioxidant activity ที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 80 °C ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แต่ที่อุณหภูมิ 40 °C มี antioxidant activity ต่ำกว่าอุณหภูมิอื่น

### 3.3 การวิเคราะห์ antioxidant activity โดย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging assay : (ABTS assay)

#### 3.3.1 การเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ) ชั่ง ABTS 0.0960 g ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL ในขวดปริมาตร

2. สารละลาย 140 mM potassium persulfate ชั่ง potassium persulfate 0.9461 g ละลายใน deionized water ปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL ในขวดปริมาตร

3. สารละลาย ABTS<sup>+</sup> reagent โดยผสมสารละลาย 7 mM ABTS reagent 5 mL กับ 140 mM potassium persulfate 88  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ 16 ชั่วโมงในที่มืด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water เป็น 25 mL เจือจาง สารละลาย ABTS<sup>+</sup> reagent ให้ได้ค่า Absorbance อยู่ในช่วง  $0.70 \pm 0.05$  ที่ความยาวคลื่น 734 nm

#### 4. สารละลายตัวอย่าง

4.1 สารสกัดจากพืชสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O

เจือจางสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.11 ความเข้มข้น 1.67% (w/v) เป็น 0.83%(w/v) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 12.5 mL ปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL ในขวดปริมาตร

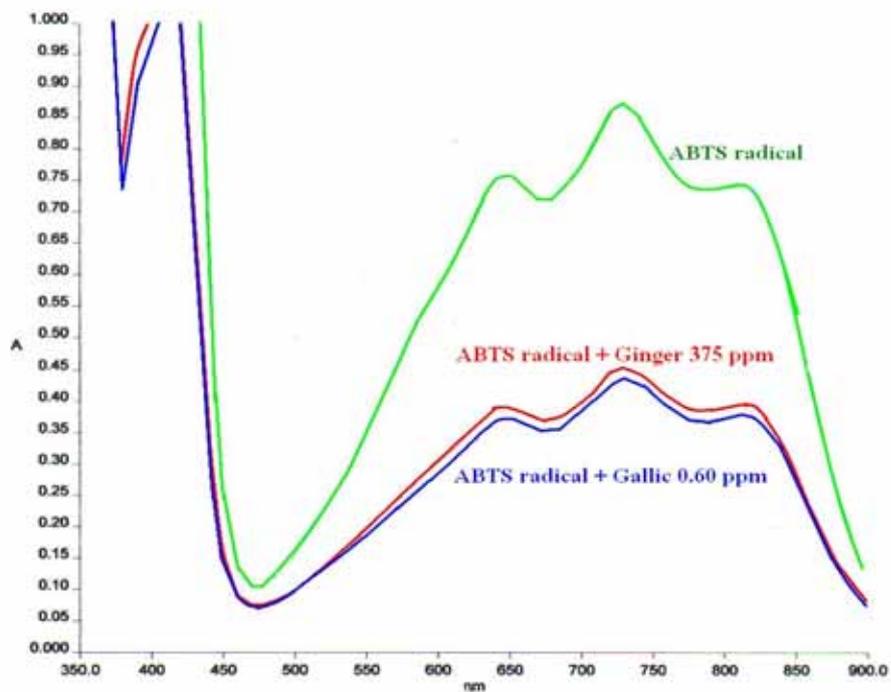
4.2 สารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำ

เจือจางสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.12 ความเข้มข้น 10% (w/v) เป็น 1%(w/v) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1.00 mL ปรับปริมาตรเป็น 10.00 mL ในขวดปริมาตร

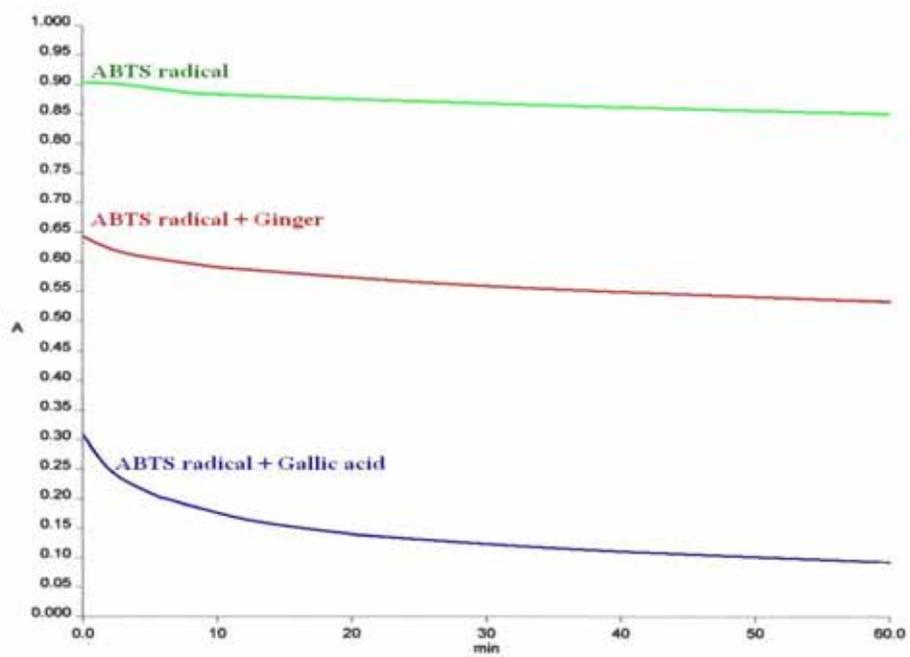
#### 3.3.2 การศึกษา kinetic behavior ของ ABTS assay

##### วิธีการทดลอง

บันทึก Spectrum ในช่วงความยาวคลื่น 350-900 nm ของสารละลาย ABTS<sup>+</sup> reagent ABTS<sup>+</sup> reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 0.60 ppm และสารสกัดขิง เข้มข้น 375 ppm แสดงในรูปที่ 23 จากนั้นบันทึก absorbance ที่ความยาวคลื่น 730 nm ซึ่งเป็นตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของ ABTS<sup>+</sup> radical เทียบกับเวลาเพื่อศึกษา Kinetic curves ของ ABTS<sup>+</sup> reagent, ABTS<sup>+</sup> reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และ ABTS<sup>+</sup> reagent ผสมกับสารสกัดขิง โดยใช้ Blank เป็นน้ำ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 23 Spectrum ของ  $ABTS^{\bullet}$  reagent และ  $ABTS^{\bullet}$  reagent ผสมกับสารต้านออกซิเดชั่น



รูปที่ 24 Kinetic curve ของ  $ABTS^{\bullet}$  reagent และ  $ABTS^{\bullet}$  reagent ผสมกับสารต้านออกซิเดชั่น

จากรูปที่ 23 พบว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์คือ 730 nm และศึกษา Kinetic curves ของสารสกัดขิงและสารมาตรฐาน gallic acid กับ ABTS<sup>+</sup> reagent พบว่าในช่วงภายในเวลา 10 นาทีหลังจากผสม ABTS<sup>+</sup> reagent กับสารต้านออกซิเดชั่น ค่า absorbance มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่หลังจากเวลา 30 นาทีเป็นต้นไป จึงใช้เวลา 30 นาทีหลังการผสมสารต้านออกซิเดชั่น กับ ABTS<sup>+</sup> reagent เพื่อการตรวจวัดปริมาณ ABTS<sup>+</sup> radical ที่เหลือหลังจากปฏิกิริยาต่อไป

### 3.3.3 การวิเคราะห์ antioxidant activity ในสารสกัดขิงโดย ABTS assay

#### วิธีการทดลอง

ผสมสารละลายมาตรฐาน gallic acid กับสารละลาย ABTS<sup>+</sup> reagent 2.0 mL ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ gallic acid เป็น 0.2 - 1.0 ppm และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำ ให้ปริมาตรรวมสุดท้ายเป็น 4.00 mL หลังจากผสมเข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 730 nm โดยใช้ Blank เป็นน้ำ และ Control เป็นสารละลายผสม ABTS reagent 2.00 mL กับน้ำ 2.00 mL ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนสารละลายมาตรฐาน gallic acid เป็นสารสกัดขิงเจือจางที่เตรียมขึ้นในข้อ 3.3.1 โดยใช้ปริมาตรของสารสกัดตามตารางที่ 13

คำนวณ % Remaining ABTS<sup>+</sup> ตามสมการ (2)

$$\% \text{Remaining ABTS}^{+\bullet} = \frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

ตารางที่ 13 ปริมาตรสารละลายตัวอย่างกับสารละลาย ABTS<sup>+</sup> reagent และน้ำที่ใช้ใน ABTS assay

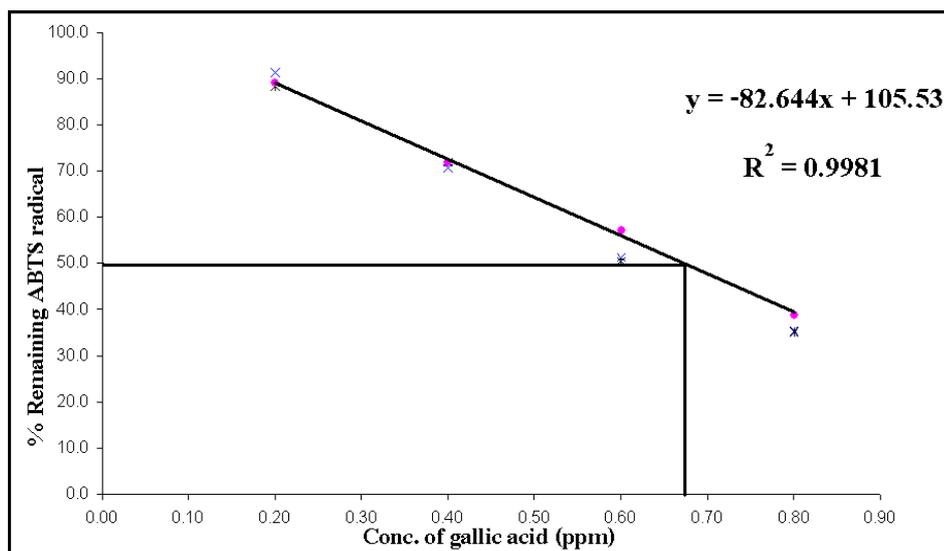
หลอดที่	ปริมาตรสารละลาย		
	Ginger (μL)	ABTS <sup>+</sup> (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)
Control	0	2.00	2.00
1	50	2.00	1.95
2	100	2.00	1.90
3	150	2.00	1.85
4	200	2.00	1.80
5	250	2.00	1.75

### ผลการทดลอง

ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 14 กราฟที่พลอตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับ ความเข้มข้น แสดงในรูป 25 ส่วนของสารสกัดจากขิงแสดงในตารางที่ 15 – 26 และรูปที่ 26 - 37 ตามลำดับ

ตารางที่ 14 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical ของสารมาตรฐาน gallic acid โดย ABTS assay (n = 3)

Gallic acid conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
Control	0.8160	-	0.8160	-	0.8160	-
0.20	0.7449	91.3	0.7205	88.3	0.7259	89.0
0.40	0.5760	70.6	0.5866	71.9	0.5860	71.8
0.60	0.4186	51.3	0.4116	50.4	0.4668	57.2
0.80	0.2886	35.4	0.2868	35.1	0.3156	38.7
1.00	0.2466	30.2	0.2355	28.9	0.2325	28.5



รูปที่ 25 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

ค่า EC<sub>50</sub> ของ gallic acid ผลิตจากการทดลองซ้ำทั้ง 3 ครั้ง เท่ากับ 0.643 ppm ซึ่งจะนำไปใช้เปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg/g dried sample ต่อไป

#### ผลการทดลอง

ตารางที่ 15 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเปลือกขิงสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.7145	-	0.6982	-	0.7124	-
104	0.5648	79.0	0.5701	81.7	0.5658	79.4
208	0.4230	59.2	0.4324	61.9	0.4098	57.5
313	0.3356	47.0	0.3120	44.7	0.3041	42.7
417	0.1290	18.1	0.1199	17.2	0.0989	13.9
521	0.0331	4.6	0.0361	5.2	0.0298	4.2

ตารางที่ 16 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อจิงศักดิ์ด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.7145	-	0.6983	-	0.6793	-
104	0.4373	61.2	0.4264	61.1	0.4153	61.1
208	0.3174	44.4	0.3068	43.9	0.2954	43.5
313	0.2200	30.8	0.2136	30.6	0.2026	29.8
417	0.1419	19.9	0.1330	19.0	0.1219	17.9
521	0.0464	6.5	0.0436	6.2	0.0419	6.2

ตารางที่ 17 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อจิงศักดิ์ด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 40 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.7366	-	0.7366	-	0.7366	-
50	0.5258	71.4	0.5256	71.3	0.5302	72.0
100	0.4903	66.6	0.4990	67.7	0.4831	65.6
200	0.4144	56.3	0.3936	53.4	0.4066	55.2
301	0.3434	46.6	0.3478	47.2	0.3545	48.1
401	0.7366	39.3	0.7366	40.0	0.7366	39.6

ตารางที่ 18 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำ  
แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 50 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.7627	-	0.7627	-	0.7366	-
50	0.5411	70.9	0.5024	65.9	0.4960	67.3
100	0.4682	61.4	0.4767	62.5	0.4356	59.1
200	0.3648	47.8	0.3716	48.7	0.3329	45.2
300	0.2783	36.5	0.2818	36.9	0.2496	33.9
400	0.1878	24.6	0.1806	23.7	0.1719	23.3

ตารางที่ 19 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำ  
แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 60 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.7656	-	0.7627	-	0.7627	-
50	0.5564	72.7	0.5339	70.0	0.5397	70.8
100	0.5018	65.5	0.4765	62.5	0.4760	62.4
201	0.3760	49.1	0.3597	47.2	0.3630	47.6
301	0.3094	40.4	0.2709	35.5	0.2746	36.0
401	0.2265	29.6	0.1800	23.6	0.1932	25.3

ตารางที่ 20 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำ  
แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 70 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.7656	-	0.7627	-	0.7627	-
50	0.5335	69.7	0.5366	70.3	0.5149	67.5
100	0.4810	62.8	0.4612	60.5	0.4598	60.3
200	0.3687	48.2	0.3393	44.5	0.3538	46.4
300	0.2890	37.8	0.2570	33.7	0.2635	34.5
400	0.1999	26.1	0.2036	26.7	0.1933	25.3

ตารางที่ 21 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำ  
แบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 3)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)					
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.7656	-	0.7627	-	0.7627	-
50	0.6151	80.3	0.6015	78.9	0.6003	78.7
100	0.5630	73.5	0.5495	72.0	0.5551	72.8
200	0.4886	63.8	0.4764	62.5	0.4581	60.1
300	0.4295	56.1	0.4073	53.4	0.3918	51.4
400	0.3672	48.0	0.3140	41.2	0.3123	40.9

ตารางที่ 22 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ  
แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.8300	-	0.8758	-	0.8513	-	0.8283	-	0.8705	-
125	0.6645	80.1	0.7020	80.2	0.6768	79.5	0.7079	85.5	0.6389	73.4
250	0.5464	65.8	0.5287	60.4	0.5373	63.1	0.5703	68.9	0.4988	57.3
375	0.3735	45.0	0.4136	47.2	0.3946	46.4	0.3979	48.0	0.3613	41.5
500	0.2915	35.1	0.2433	27.8	0.2527	29.7	0.2866	34.6	0.2065	23.7
625	0.1887	22.7	0.1961	22.4	0.2016	23.7	0.2019	24.4	0.1690	19.4

ตารางที่ 23 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ  
แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 50 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5)

Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>+</sup> (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.8300	-	0.8758	-	0.8513	-	0.8283	-	0.8705	-
125	0.6780	81.7	0.6698	76.5	0.6414	75.3	0.6690	80.8	0.6767	77.7
250	0.5069	61.1	0.5019	57.3	0.5307	62.3	0.4959	59.9	0.4969	57.1
375	0.3616	43.6	0.3584	40.9	0.3445	40.5	0.3557	42.9	0.3678	42.3
500	0.2353	28.3	0.1920	21.9	0.2557	30.0	0.2056	24.8	0.2292	26.3
625	0.1406	16.9	0.1275	14.6	0.1881	22.1	0.1559	18.8	0.1342	15.4

ตารางที่ 24 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ  
แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 60 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5)

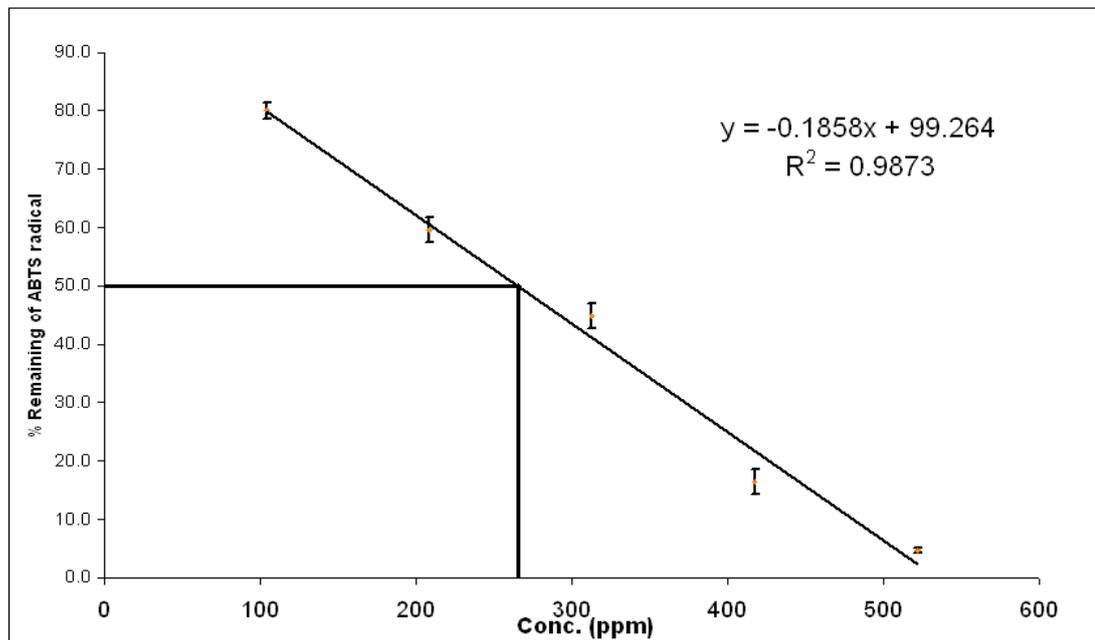
Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.8300	-	0.8758	-	0.8513	-	0.8283	-	0.8705	-
125	0.6588	79.4	0.6666	76.1	0.6387	75.0	0.6404	77.3	0.6426	73.8
250	0.5158	62.1	0.4836	55.2	0.5069	59.5	0.5631	68.0	0.4848	55.7
375	0.3691	44.5	0.3326	38.0	0.3041	35.7	0.4744	57.3	0.2855	32.8
500	0.2170	26.1	0.1704	19.5	0.1614	19.0	0.3284	39.6	0.1489	17.1
625	0.153	18.4	0.1023	11.7	0.0818	9.6	0.2582	31.2	0.0988	11.3

ตารางที่ 25 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำ  
แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 70 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5)

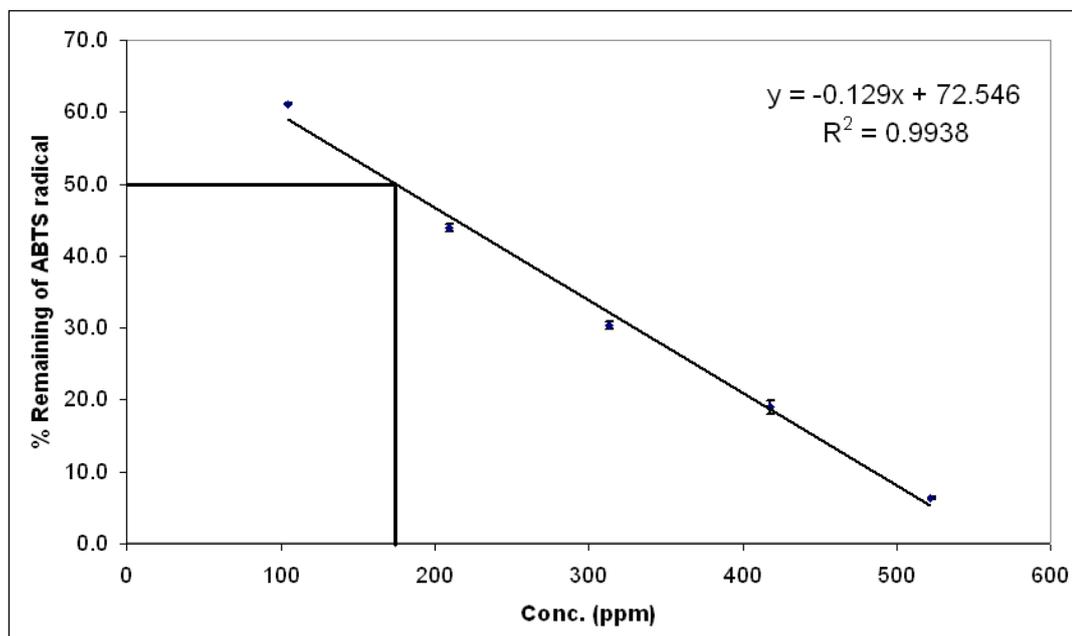
Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.8300	-	0.8758	-	0.8513	-	0.8283	-	0.8705	-
125	0.6654	80.2	0.6528	74.5	0.6385	75.0	0.6658	80.4	0.5992	68.8
250	0.4819	58.1	0.4562	52.1	0.4397	51.7	0.5006	60.4	0.4499	51.7
375	0.2998	36.1	0.2895	33.1	0.2905	34.1	0.3276	39.6	0.2800	32.2
500	0.1610	19.4	0.1435	16.4	0.1727	20.3	0.2238	27.0	0.1434	16.5
625	0.0839	10.1	0.0792	9.0	0.1029	12.1	0.1411	17.0	0.1340	15.4

ตารางที่ 26 ค่า Absorbance และ % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical จากสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำ  
แบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 80 °C โดยวิธี ABTS assay (n = 5)

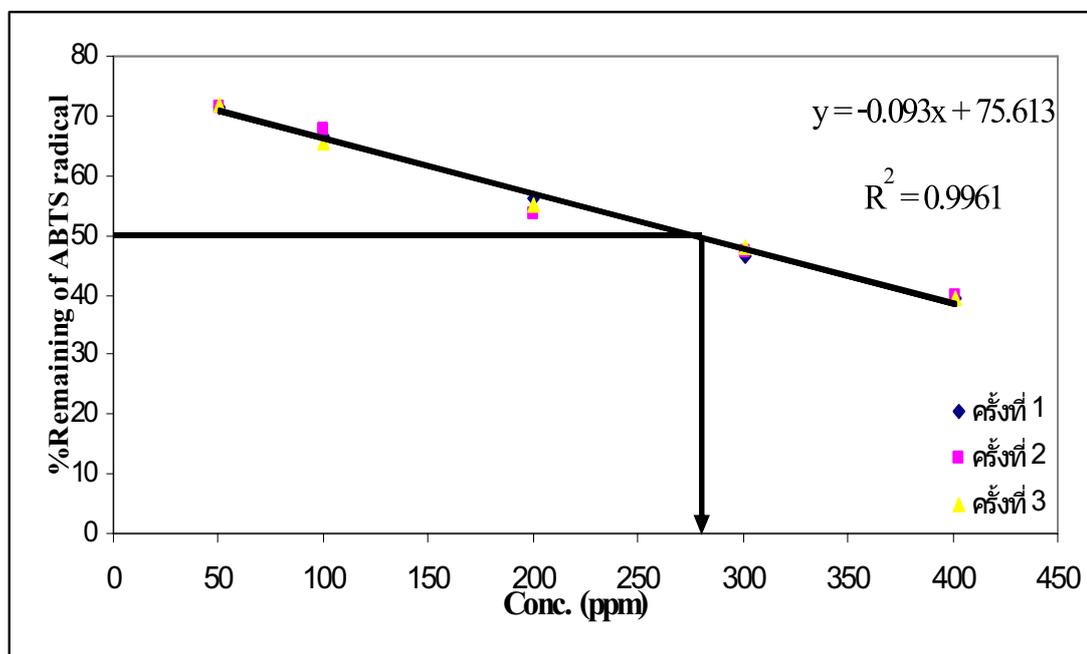
Sample conc. (ppm)	Absorbance และ % Remaining ABTS <sup>•+</sup> (%R)									
	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		ครั้งที่ 4		ครั้งที่ 5	
	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R	Abs.	%R
control	0.8300	-	0.8758	-	0.8513	-	0.8283	-	0.8705	-
125	0.6511	78.4	0.6501	74.2	0.6444	75.7	0.6167	74.5	0.6411	73.6
250	0.4701	56.6	0.3914	44.7	0.4894	57.5	0.4927	59.5	0.4709	54.1
375	0.3821	46.0	0.3237	37.0	0.2964	34.8	0.3361	40.6	0.3719	42.7
500	0.2269	27.3	0.1670	19.1	0.1759	20.7	0.2434	29.4	0.2119	24.3
625	0.1545	18.6	0.0951	10.9	0.1027	12.1	0.1613	19.5	0.1060	12.2



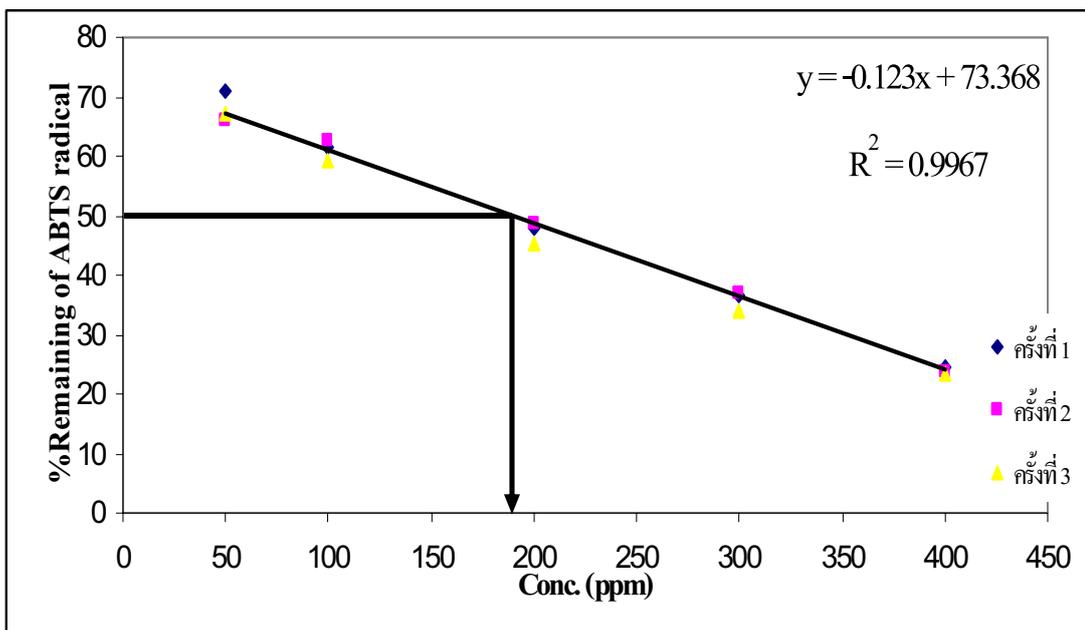
รูปที่ 26 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจาก  
เปลือกขิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O



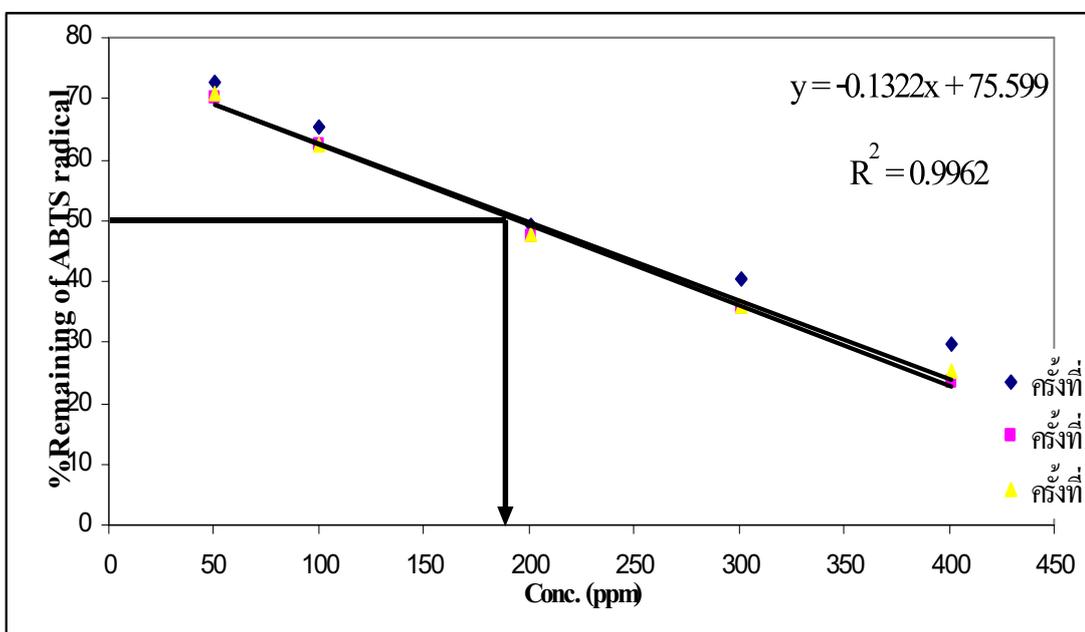
รูปที่ 27 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อ  
 ฝรั่งด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O



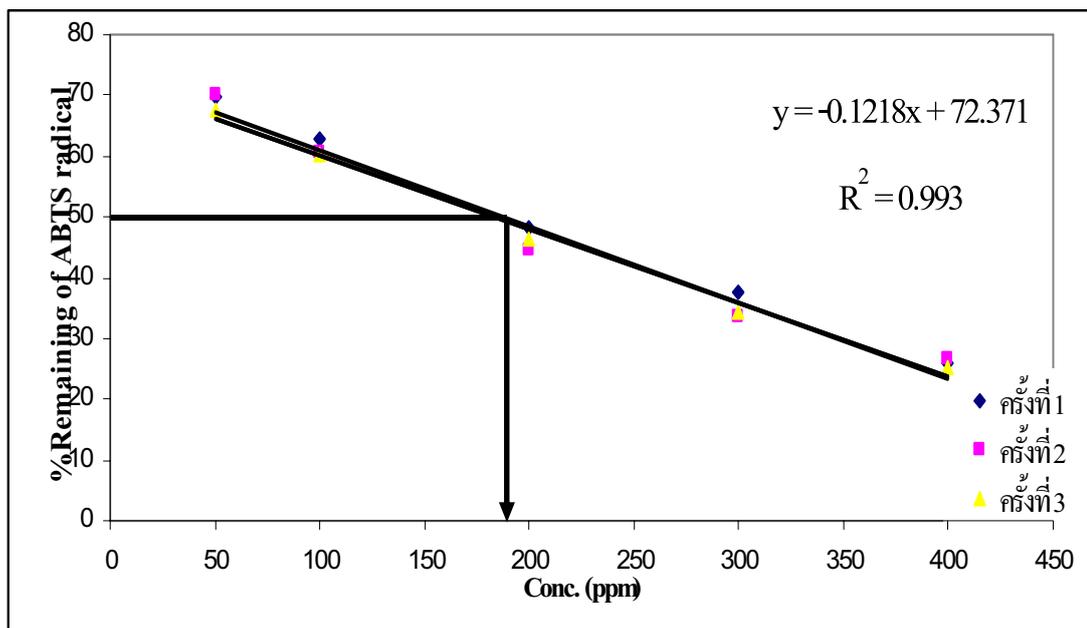
รูปที่ 28 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อ  
 ฝรั่งด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 40 °C



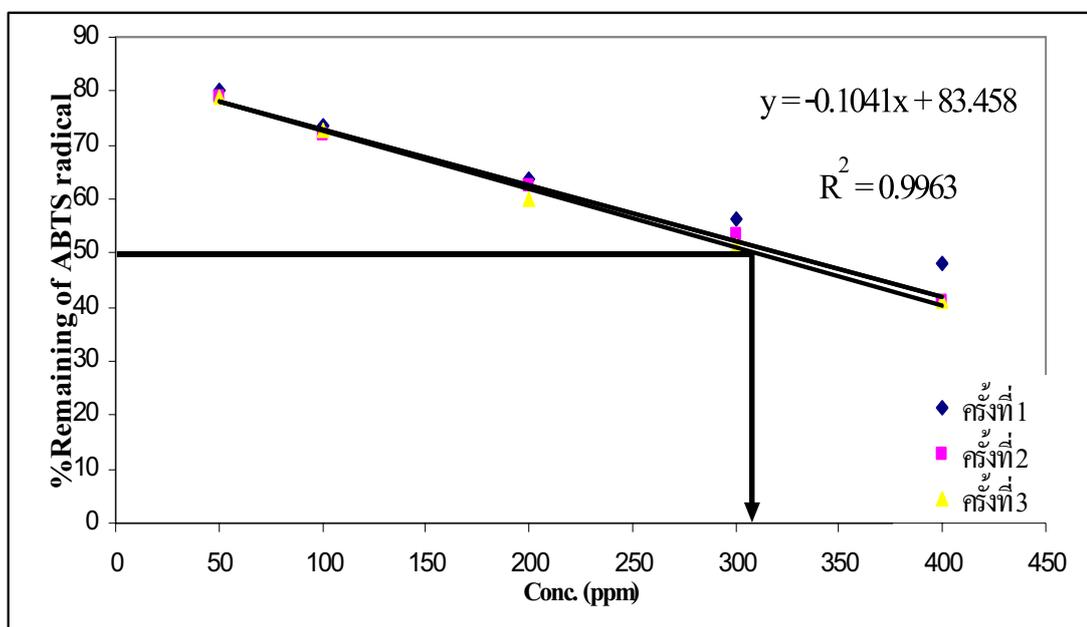
รูปที่ 29 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>•</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อ  
 鯖ด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 50 °C



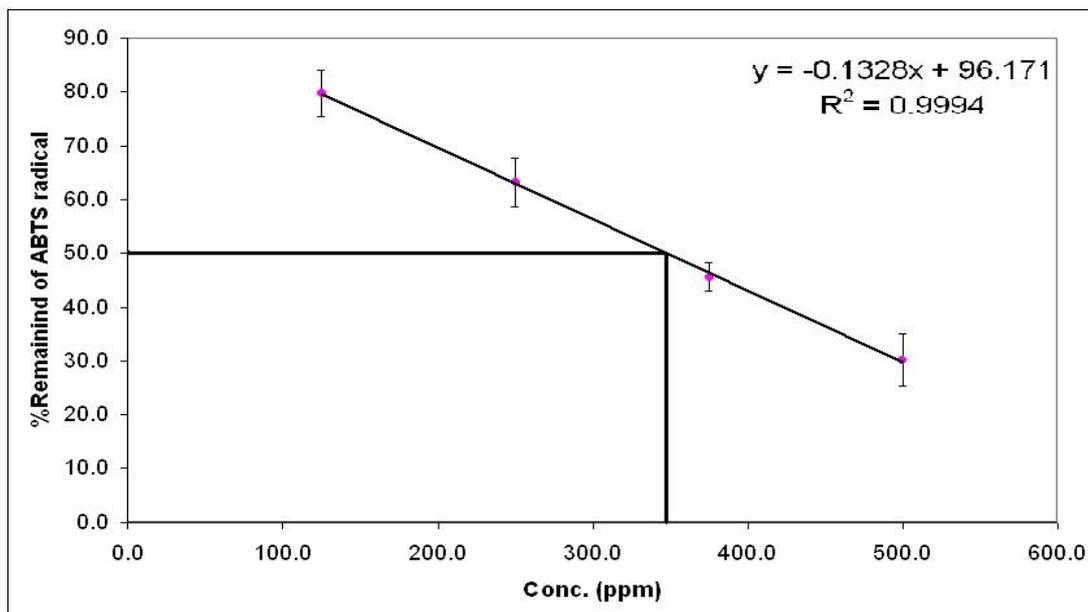
รูปที่ 30 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>•</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อ  
 鯖ด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 60 °C



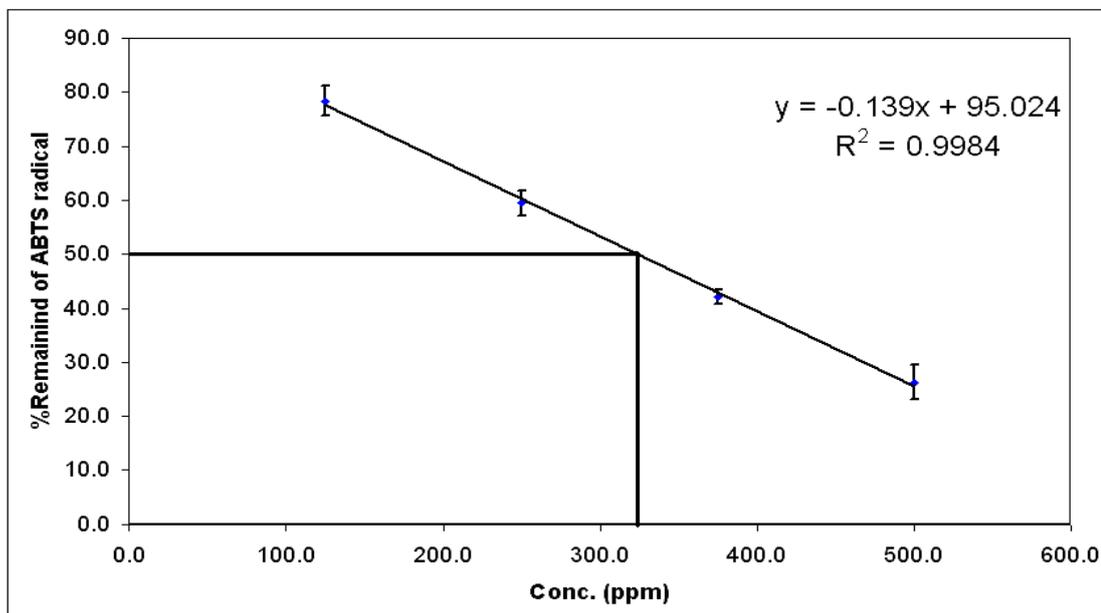
รูปที่ 31 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อ  
 ฝรั่งด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 70 °C



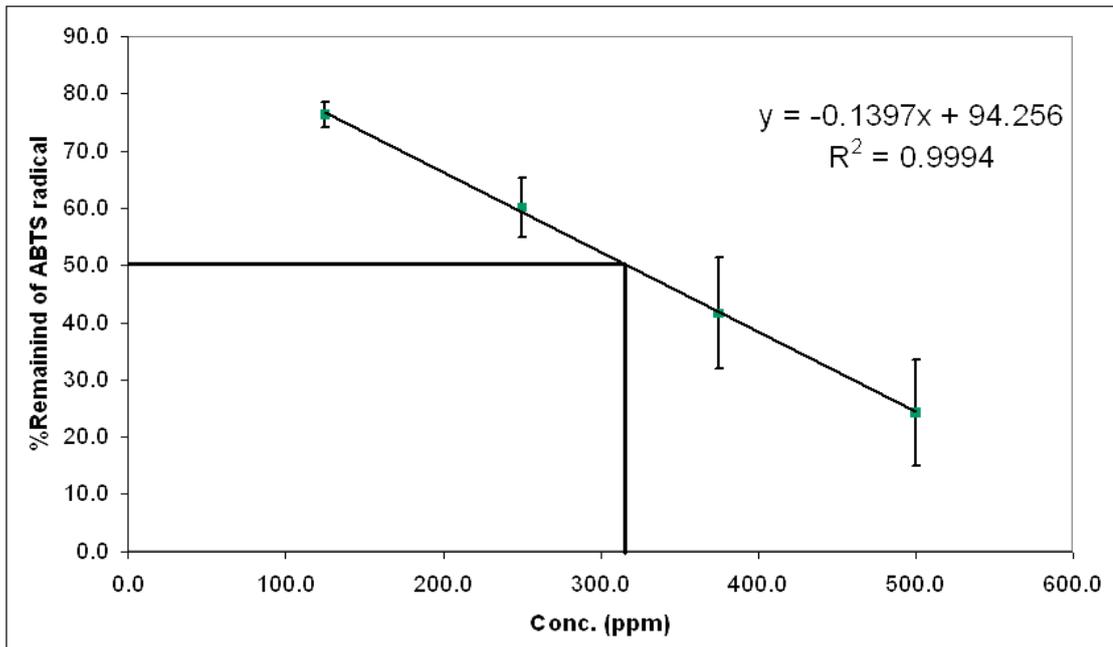
รูปที่ 32 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>•+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อ  
 ฝรั่งด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 80 °C



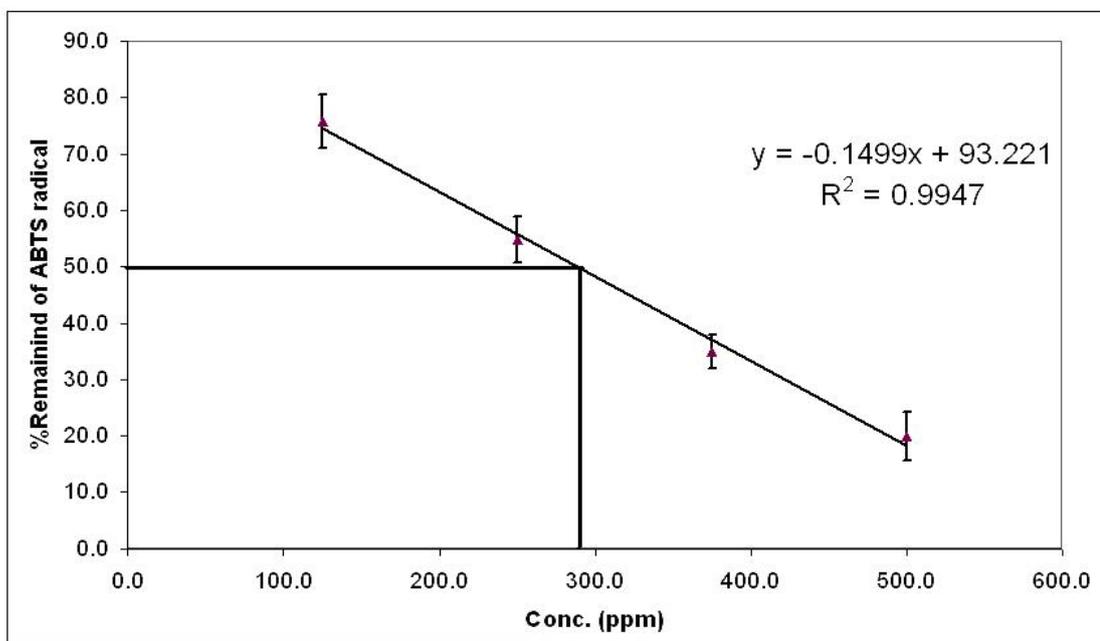
รูปที่ 33 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40 °C



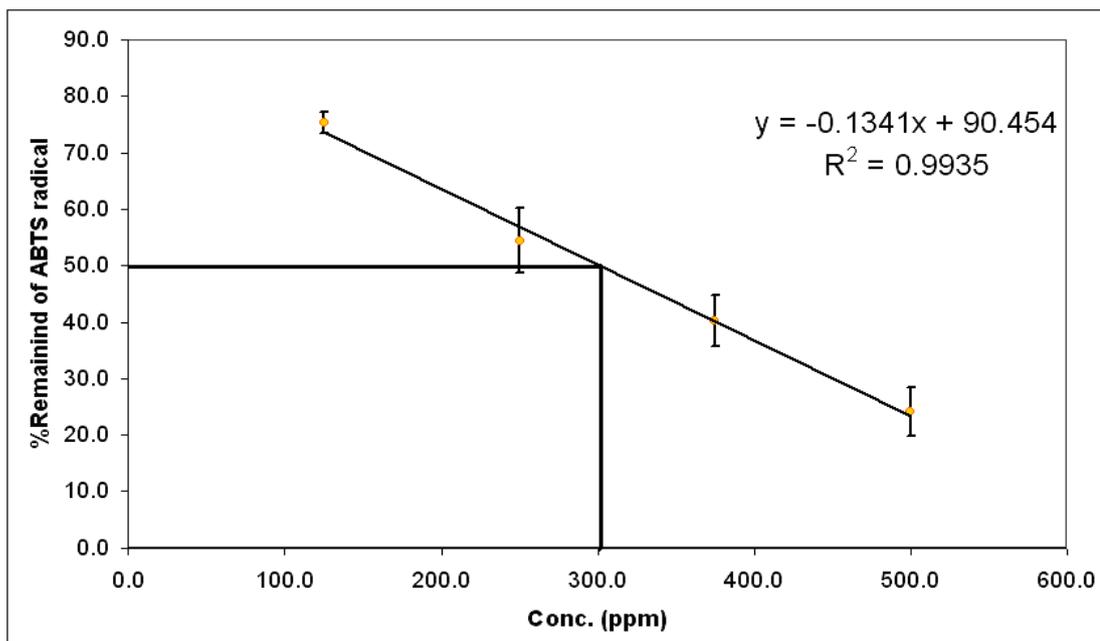
รูปที่ 34 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 50 °C



รูปที่ 35 ผลระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 60 °C



รูปที่ 36 ผลระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 70 °C



รูปที่ 37 พล็อตระหว่าง % Remaining ABTS<sup>+</sup> radical (%R) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 80 °C

ค่า EC<sub>50</sub> ของสารสกัดจากขิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O และน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงดังตารางที่ 27 - 29 ตามลำดับ

ตารางที่ 27 ค่า EC<sub>50</sub> ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อขิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O ที่ โดย ABTS assay (n = 3)

สารสกัดจากขิง	EC <sub>50</sub> (ppm)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
เนื้อขิง	177	175	172	175 ± 3
เปลือกขิง	267	272	257	265 ± 8

ตารางที่ 28 ค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 3)

Infusion temperature (°C)	$EC_{50}$ (ppm)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD
40	275	275	278	276 $\pm$ 2
50	196	190	176	187 $\pm$ 10
60	223	194	198	205 $\pm$ 16
70	201	187	184	191 $\pm$ 9
80	369	321	310	333 $\pm$ 31

ตารางที่ 29 ค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 5)

Infusion temperature (°C)	$EC_{50}$ (ppm)					ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	
40	365	350	348	379	305	349 $\pm$ 28
50	338	307	329	327	319	324 $\pm$ 12
60	334	294	294	419	279	324 $\pm$ 57
70	303	274	280	325	258	288 $\pm$ 28
80	329	267	294	320	302	302 $\pm$ 24

จากค่า  $EC_{50}$  คำนวณ antioxidant activity โดยการเทียบกับค่า  $EC_{50}$  ที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid ซึ่งเท่ากับ 0.643 ppm รายงาน antioxidant activity เป็น gallic acid equivalent (GAE) ค่า GAE ที่คำนวณได้แสดงดังตารางที่ 30 - 32

ตารางที่ 30 ค่า GAE ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อจึงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O ที่ โดย ABTS assay (n = 3)

สารสกัดจากจึง	GAE (mg/ g dried sample)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
เนื้อจึง	3.63	3.68	3.73	3.68 ± 0.05
เปลือกจึง	2.41	2.37	2.50	2.43 ± 0.07

ตารางที่ 31 ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 3)

Infusion temperature (°C)	GAE (mg/ g dried sample)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
40	0.76	0.76	0.75	0.76 ± 0.00
50	1.06	1.11	1.18	1.12 ± 0.06
60	0.94	1.07	1.05	1.02 ± 0.07
70	1.04	1.11	1.14	1.10 ± 0.05
80	0.57	0.65	0.67	0.63 ± 0.06

ตารางที่ 32 ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย ABTS assay (n = 5)

Infusion temperature (°C)	GAE (mg/ g dried sample)					
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ค่าเฉลี่ย ± SD
40	1.76	1.84	1.85	1.70	2.11	1.85 ± 0.16
50	1.90	2.10	1.96	1.97	2.02	1.99 ± 0.07
60	1.93	2.19	2.19	1.54	2.3	2.03 ± 0.31
70	2.12	2.35	2.30	1.98	2.49	2.25 ± 0.20
80	1.96	2.41	2.19	2.01	2.13	2.14 ± 0.18

จากค่า GAE ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อขิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O พบว่าในเนื้อขิงมีค่า GAE มากกว่าในเปลือกของขิง และเนื่องจากการบริโภคนั้นไม่ได้ใช้ตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O แต่ใช้น้ำ ดังนั้นจึงเลือกทดลองการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 80 °C มีค่า GAE น้อยที่สุด แต่เมื่อใช้การสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิทุกอุณหภูมิในช่วง 40-80 °C และใช้การวิเคราะห์ทางสถิติคือ one way ANOVA พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40-80 °C มีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.05)

### 3.4 การหาปริมาณ Total phenolic compounds ในสารสกัดจากขิงด้วยเทคนิค Folin-Denis assay

#### 3.4.1 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 และ phosphoric acid 5 mL [33] 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

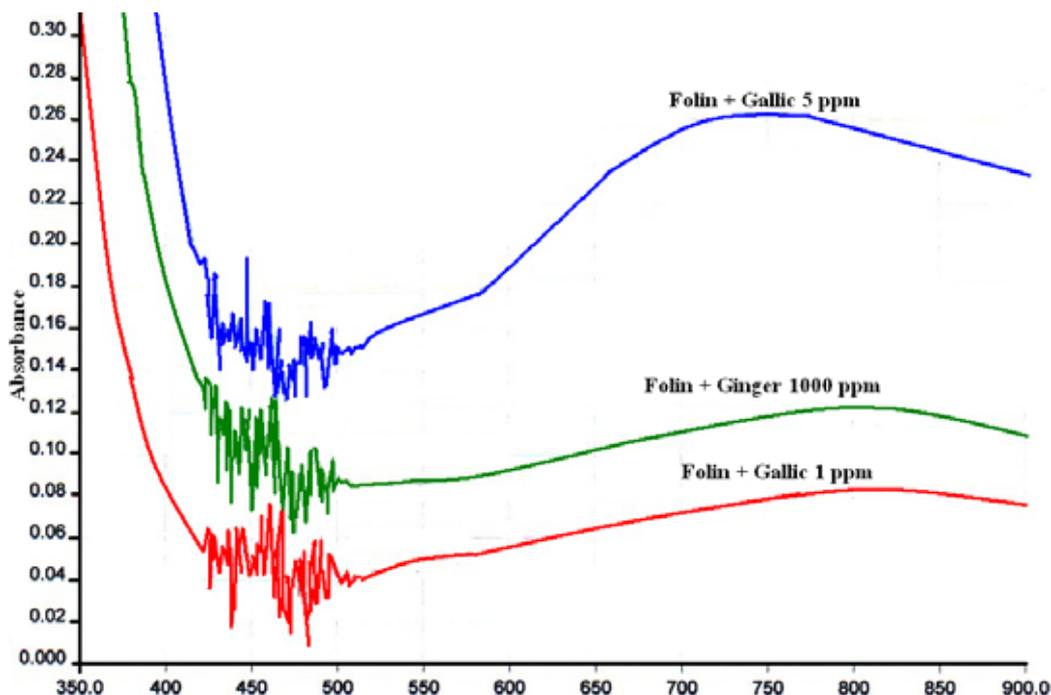
### 3. สารละลายอิมตัวของ $\text{NaHCO}_3$

ละลาย  $\text{NaHCO}_3$  ใน deionized water จนกระทั่ง  $\text{NaHCO}_3$  ไม่ละลาย กรองด้วยกระดาษกรอง ได้สารละลายอิมตัวของ  $\text{NaHCO}_3$

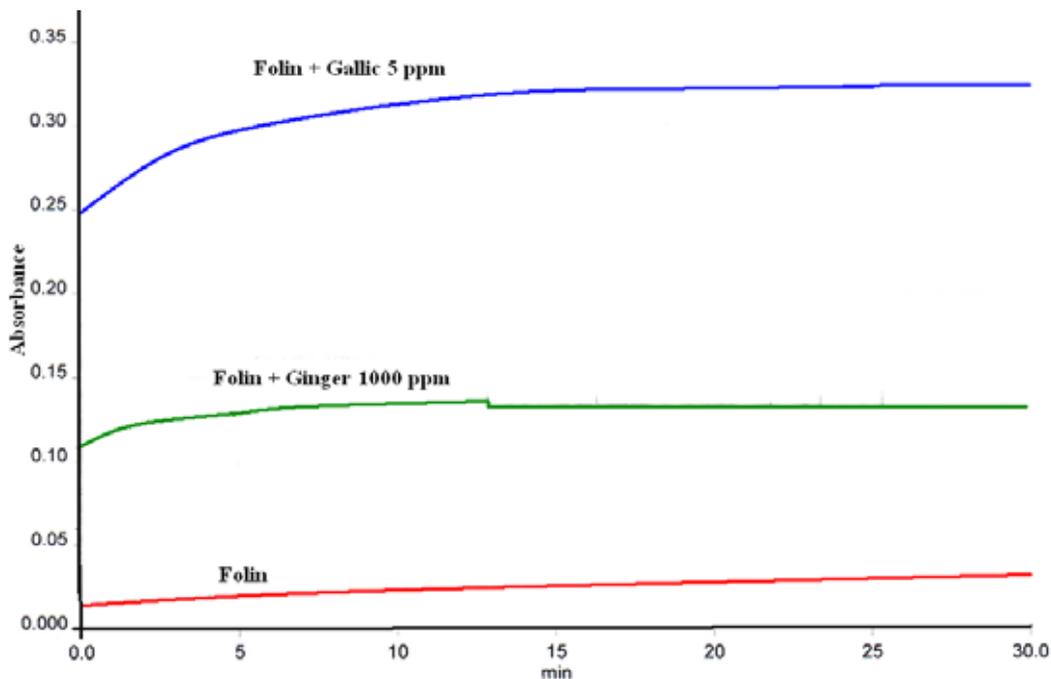
#### 3.4.2 การศึกษา kinetic behavior ของ Folin-Denis assay

##### วิธีการทดลอง

บันทึก Spectrum ในช่วงความยาวคลื่น 350-900 nm UV/VIS spectrometer Lambda 35 (Perkin Elmer) ของสารละลาย Folin - Denis reagent และ Folin-Denis reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เข้มข้น 1.0 ppm และสารสกัดขิง เข้มข้น 1000 ppm แสดงในรูปที่ 38 จากนั้นบันทึก absorbance ที่ความยาวคลื่น 728 nm เทียบกับเวลาเพื่อศึกษา Kinetic ของ Folin-Denis reagent และ Folin-Denis reagent เมื่อผสมกับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เข้มข้น 5.0 ppm และสารสกัดขิง เข้มข้น 1000 ppm โดยใช้ Blank เป็นน้ำ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 39



รูปที่ 38 Spectrum ของ Folin-Denis reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดขิง



รูปที่ 39 Kinetic curve ของ Folin-Denis reagent และ Folin-Denis reagent ผสมกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดขิง

### 3.4.3 การหาปริมาณ phenolic compound ในสารสกัดขิง โดย Folin-Denis assay

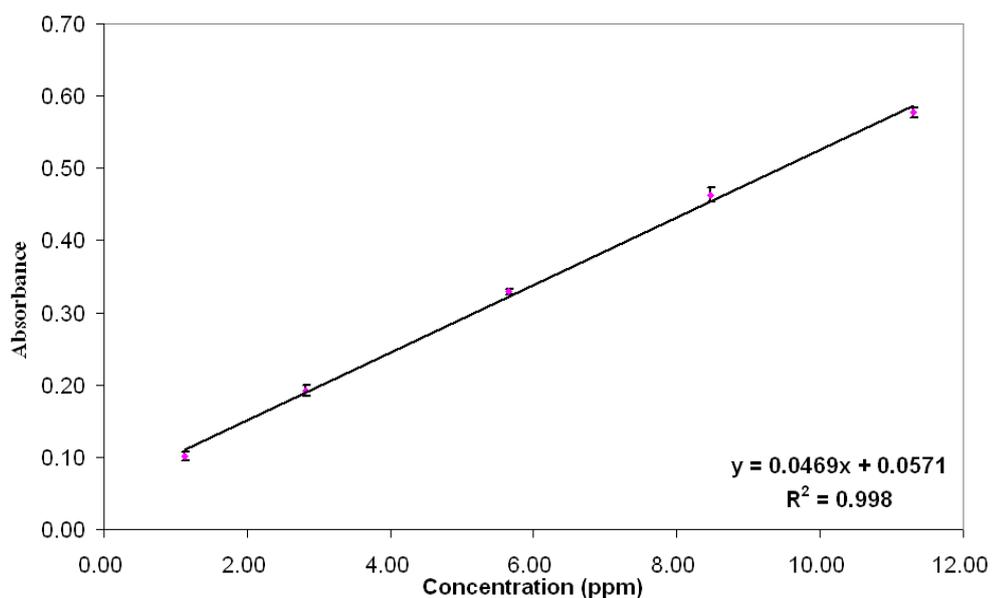
#### วิธีการทดลอง

ปีเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 100 ppm ปริมาตรต่างๆผสมกับสารละลาย Folin – Denis 0.80 mL และ สารละลายอิมิตัว  $\text{NaHCO}_3$  0.80 mL ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL ด้วย deionized water หลังผสมเข้ากัน 18 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ 728 nm ค่า absorbance ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 33 เขียนกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid แสดงดังรูปที่

## ผลการทดลอง

ตารางที่ 33 ค่า absorbance ที่ 728 nm ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

หลอดที่	ปริมาตร Gallic acid ( $\mu\text{L}$ )	ความเข้มข้น Gallic acid (ppm)	Absorbance		
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	100	1.13	0.0950	0.1056	0.1051
2	250	2.83	0.1894	0.1999	0.1861
3	500	5.65	0.3250	0.3307	0.3316
4	750	8.48	0.4736	0.4532	0.4633
5	1000	11.3	0.5805	0.5696	0.5818



รูปที่ 40 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยเทคนิค Folin-Denis Assay

ทำการทดลองกับสารสกัดจากขิง โดยใช้สารสกัดจากขิงที่เตรียมจากข้อ 3.1.2 และ 3.1.3 ปริมาตร 500  $\mu\text{L}$  แล้วเปรียบเทียบค่า absorbance ที่ 728 nm กับกราฟมาตรฐานของ gallic acid เพื่อหาค่า GAE (mg/g dried sample) ของสารตัวอย่าง ได้ผลในตารางที่ 34 - 36

ตารางที่ 34 ค่า absorbance และค่าปริมาณ total phenolic compounds ทั้งหมดในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อขิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) โดย Folin-Denis assay (n = 3)

สารสกัด จากขิง	Absorbance			GAE (mg/ g dried sample)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
เนื้อขิง	0.3028	0.3301	0.3181	0.81	0.88	0.85	0.85 ± 0.04
เปลือกขิง	0.1006	0.0925	0.1099	0.28	0.26	0.31	0.28 ± 0.02

จากค่า GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อขิงด้วยตัวทำละลาย Acetone: Methanol: H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) พบว่าสารสกัดจากเนื้อขิงมีปริมาณ total phenolic compounds มากกว่าสารสกัดจากเปลือกขิงประมาณ 3 เท่า

ตารางที่ 35 ค่า GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย Folin-Denis assay (n = 3)

Infusion temperature (°C)	GAE (mg/ g dried sample)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
40	0.32	0.33	0.27	0.28 ± 0.03
50	0.33	0.30	0.32	0.31 ± 0.01
60	0.32	0.33	0.31	0.32 ± 0.01
70	0.38	0.40	0.38	0.39 ± 0.01
80	0.36	0.33	0.35	0.35 ± 0.01

ตารางที่ 36 ค่า GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดย Folin-Denis assay (n = 5)

Infusion temperature (°C)	GAE (mg/ g dried sample)					
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ค่าเฉลี่ย ± SD
40	0.93	0.99	0.93	1.01	0.92	0.96 ± 0.04
50	1.09	1.03	1.13	1.07	1.12	1.09 ± 0.04
60	1.07	1.12	1.19	0.96	1.21	1.11 ± 0.10
70	1.34	1.43	1.32	1.32	1.43	1.37 ± 0.06
80	1.34	1.16	1.21	1.32	1.38	1.28 ± 0.09

จากตารางที่ 35 และ 36 ค่า GAE (mg/g dried sample) ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 °C พบว่าเมื่อใช้การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติคือ one way ANOVA เพื่อดูแนวโน้มของค่าที่วิเคราะห์ได้พบว่าปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 80 °C มีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.05) แต่มีปริมาณ total phenolic compounds น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 70 สำหรับสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 70 และ 80 °C มีปริมาณ total phenolic compounds มากกว่าที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C โดยที่อุณหภูมิ 40 °C นั้นมีปริมาณ total phenolic compounds น้อยที่สุด

### 3.5 การวิเคราะห์ antioxidant activity โดยเทคนิค Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD)

#### 3.5.1 Electrochemical behavior ของ $ABTS^{+\bullet}$ radical

การศึกษา electrochemical behavior ของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical โดยเทคนิค CV ใช้เครื่อง Autolab PGSTAT 30 พร้อมโปรแกรม GPES for window version 4.5 ใช้ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้วดังนี้ ขั้วใช้งานเป็น Glassy carbon electrode (GCE) ขั้วอ้างอิง เป็น Ag/AgCl (saturated KCl) และ ขั้วประกอบเป็น platinum disk electrode

#### 3.5.1.1 การศึกษาผลของ pH ของ supporting electrolyte ต่อ cyclic voltammogram ของ $ABTS^{+\bullet}$ radical

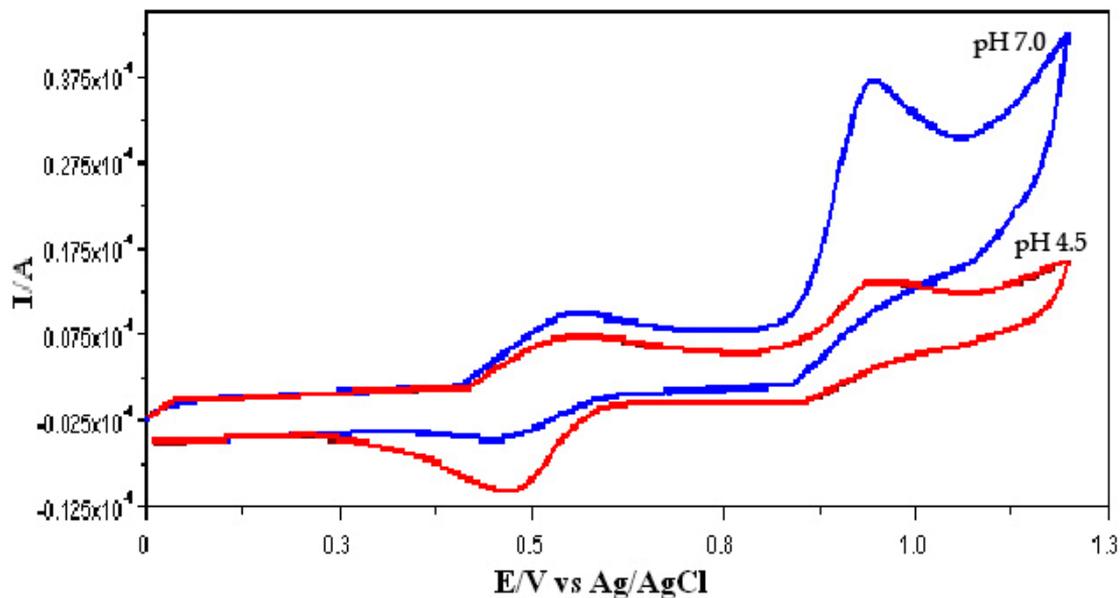
##### วิธีการทดลอง

1. เตรียมขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment ขั้ว GCE ตามหัวข้อ 3.2.1
2. ปิเปตสารละลาย  $ABTS^{+\bullet}$  radical ความเข้มข้น 7 mM ปริมาตร 3.00 mL ลงในเซลล์เคมีไฟฟ้า ปรับปริมาตรด้วย phosphate buffer pH 7.0 ที่ใช้เป็น supporting electrolyte ให้มีปริมาตรสุดท้าย 25.0 mL แล้วบันทึก cyclic voltammogram โดยใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ให้ดังนี้

Start potential (V)	:	0
First vertex potential (V)	:	1.3
Second vertex potential (V)	:	0
Scan rate (V/s)	:	0.1

3. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 1 – 2 แต่เปลี่ยนสารละลาย supporting electrolyte เป็นสารละลาย acetate buffer pH 4.5

4. ใช้โปรแกรม analysis peak search รายงานค่า Peak potential ( $E_p$ ) และ peak current ( $i_p$ ) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 41 และตารางที่ 37



รูปที่ 41 Cyclic voltammograms ของ  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  radical ใน acetate buffer pH 4.5 และ phosphate buffer pH 7.0

ตารางที่ 37 ข้อมูล peak potential ( $E_p$ ) และ peak current ( $i_p$ ) จาก cyclic voltammogram ของ  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  radical ใน supporting electrolyte ต่างกัน

Supporting electrolyte	$E_p$ (V vs Ag/AgCl)		$i_p$ ( $\mu\text{A}$ )	
	$E_{pa}$	$E_{pc}$	$i_{pa}$	$i_{pc}$
Acetate buffer pH 4.5	0.547	0.477	4.987	8.949
	0.941	0.863	4.337	3.082
Phosphate buffer pH 7.0	0.555	0.456	18.24	3.356
	0.934	0.835	5.837	5.455

$E_{pa}$  = anodic peak potential,  $E_{pc}$  = cathodic peak potential

$i_{pa}$  = anodic peak current,  $i_{pc}$  = cathodic peak current

จากรูปที่ 41 และตารางที่ 37 เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าจากด้านลบไปด้านบวกพบว่า ABTS นั้นสามารถเกิดออกซิเดชันได้ 2 ขั้นตอนเกี่ยวข้องกับ 1 อิเล็กตรอน (Two steps of electron mechanism electrode reaction) โดยขั้นแรกคือ การเกิดออกซิเดชันของ ABTS กลายเป็น  $ABTS^{+\bullet}$  radical ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.547 V vs. Ag/AgCl ขั้นที่สองคือการเกิดออกซิเดชันของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical กลายเป็น  $ABTS^{2+}$  ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.941 V vs. Ag/AgCl เมื่อ supporting electrolyte เป็น acetate buffer pH 4.5 สำหรับเมื่อ supporting electrolyte เป็น phosphate buffer pH 7.0 ABTS นั้นสามารถเกิดออกซิเดชันได้ 2 ขั้นตอน เช่นเดียวกับ pH 4.5 แต่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดออกซิเดชันต่างกันเล็กน้อยโดยค่าศักย์ไฟฟ้าที่ ABTS กลายเป็น  $ABTS^{+\bullet}$  radical คือ 0.555 V vs. Ag/AgCl และค่าศักย์ไฟฟ้าที่  $ABTS^{+\bullet}$  radical กลายเป็น  $ABTS^{2+}$  คือ 0.863 V vs. Ag/AgCl และเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้ากลับจากด้านบวกไปด้านลบพบว่าทั้งใน acetate buffer pH 4.5 และ phosphate buffer pH 7.0 ABTS ให้ผลเหมือนกันโดยรีดักชัน 2 ขั้นตอน ย้อนกลับจาก  $ABTS^{2+}$  กลายเป็น  $ABTS^{+\bullet}$  radical และรีดักชันของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical กลายเป็น ABTS โดยพบ cathodic peak ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.941 และ 0.477 V vs. Ag/AgCl เมื่อ supporting electrolyte เป็น acetate buffer pH 4.5 และที่ศักย์ไฟฟ้า 0.934 และ 0.456 V vs. Ag/AgCl เมื่อ supporting electrolyte เป็น phosphate buffer pH 7.0 ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับ electrochemical behavior ของ ABTS โดย Myrna และคณะในปี ค.ศ. 2005 [34] โดยศึกษา electrochemical behavior ของ ABTS ใน acetate buffer pH 5 รายงานค่าศักย์ไฟฟ้าในการเกิดออกซิเดชันทั้ง 2 ขั้นตอนของ ABTS เป็น 0.518 และ 0.914 V vs. Ag/AgCl และค่าศักย์ไฟฟ้าในการเกิดรีดักชันทั้ง 2 ขั้นตอนเป็น 0.419 และ 0.826 V vs. Ag/AgCl ตามลำดับ และสำหรับ phosphate buffer pH 7.0 Demir และคณะในปี ค.ศ. 2005 [34] ได้ศึกษา electrochemical behavior ของ ABTS ใน phosphate buffer pH 7.0 รายงานค่าศักย์ไฟฟ้าในการเกิดออกซิเดชันทั้ง 2 ขั้นตอนเป็น 0.498 และ 0.900 V vs. NHE และรายงานค่าศักย์ไฟฟ้าในการเกิดรีดักชันของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical กลายเป็น ABTS ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.400 V vs. NHE

การทดลองนี้จะใช้สัญญาณกระแสไฟฟ้าจากการติดตามปริมาณของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical ที่ลดลงเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วย antioxidant คือสารมาตรฐาน gallic acid หรือสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ดังนั้นจึงเลือกศักย์ไฟฟ้าในช่วง 0 – 0.8 V สำหรับใช้ในการศึกษา  $ABTS^{+\bullet}$  radical ต่อไป และเมื่อพิจารณาที่ศักย์ไฟฟ้า 0.5 V พบว่าที่ phosphate buffer pH 7.0 เป็น pH ที่ให้กระแสจากปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าที่ pH 4.5 ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย phosphate buffer นี้เป็นสารละลาย supporting electrolyte สำหรับศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical ต่อไป

### 3.5.1.2 การศึกษาผลของ scan rate ต่อ cyclic voltammogram ของ $\text{ABTS}^{\bullet}$ radical

#### radical

##### วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งาน โดยทำ pretreatment ขั้ว GCE ตามหัวข้อ 3.2.1
2. บันทึก cyclic voltammogram ของ 1.68 mM  $\text{ABTS}^{\bullet}$  radical ใน phosphate buffer pH 7.0 โดยใช้ scan rate 10, 50, 100, 200 และ 300 mV/s และใช้สภาวะต่างๆของการทดลองดังนี้

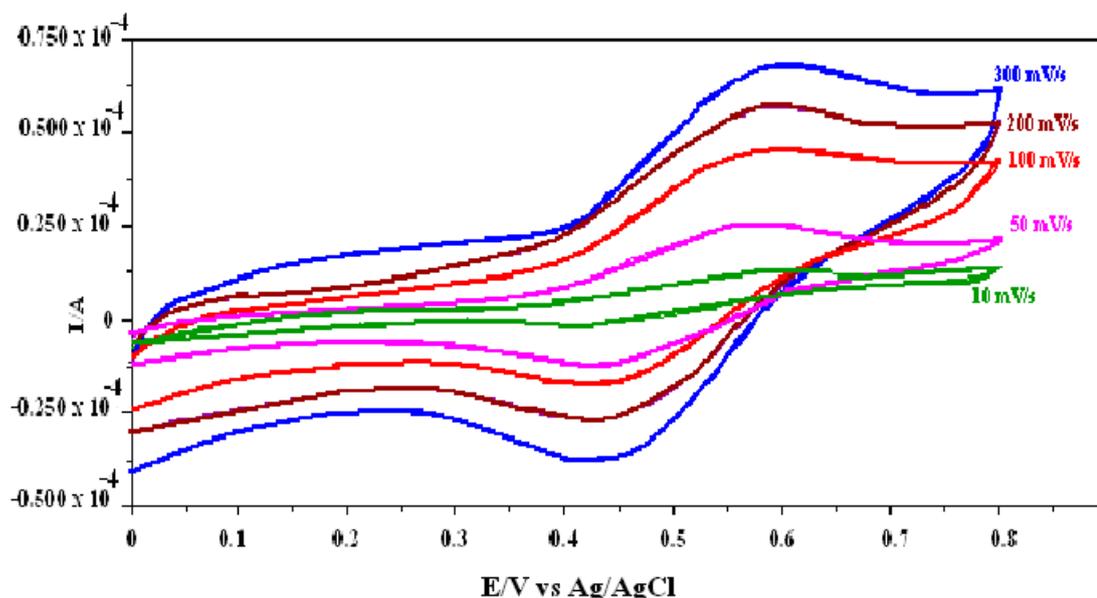
Start potential (V) : 0.0

First vertex potential (V) : 0.8

Second vertex potential (V) : 0.0

##### ผลการทดลอง

ลักษณะของ cyclic voltammogram แสดงดังรูป 42 ค่า anodic peak potential ( $E_{pa}$ ), cathodic peak potential ( $E_{pc}$ ), anodic peak current ( $i_{pa}$ ) และ cathodic peak current ( $i_{pc}$ ) แสดงดังตาราง 38 และ ค่า  $(\text{Scan rate})^{1/2}$ ,  $E_{pc} - E_{pa}$  และ  $i_{pa}/i_{pc}$  แสดงดังตารางที่ 38(A) แล้วศึกษาความสัมพันธ์ของค่ากระแส กับ scan rate (v) โดยพลอตกราฟระหว่าง  $i_{pa}$  กับ  $(\text{scan rate})^{1/2}$   $i_{pa}$  กับ scan rate และ  $\log(i_{pa})$  กับ  $\log(\text{scan rate})$  ผลที่ได้แสดงดังรูป 43 - 44 ตามลำดับ



รูปที่ 42 Cyclic voltammogram ของ 1.68 mM  $\text{ABTS}^{\bullet}$  radical ที่ scan rate ต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0

ตารางที่ 38 ข้อมูล peak potential และ peak current จาก cyclic voltammograms ของ 1.68 mM ABTS<sup>•+</sup> radical ที่ scan rate ต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0

Scan rate (mV/s)	$E_{pa}$ (V vs Ag/AgCl)	$i_{pa}$ ( $\mu$ A)	$E_{pc}$ (V vs Ag/AgCl)	$i_{pc}$ ( $\mu$ A)
10	0.551	0.523	0.467	-0.67
50	0.547	1.48	0.456	-1.73
100	0.555	1.46	0.460	-1.78
200	0.551	2.25	0.450	-2.80
300	0.562	2.65	0.456	-3.39

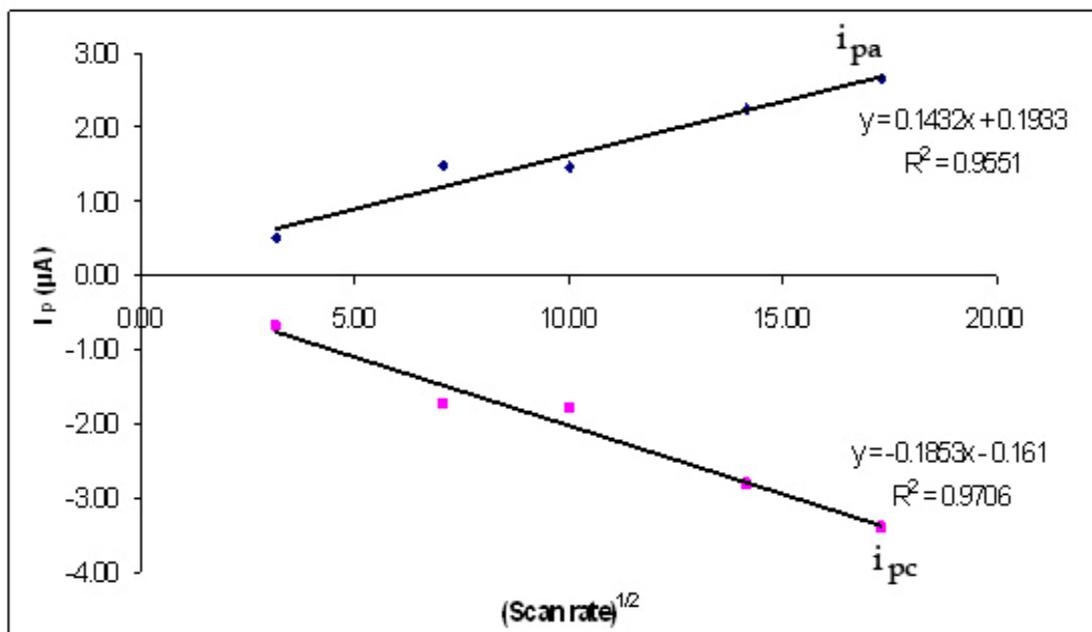
$E_{pa}$  = anodic peak potential,  $E_{pc}$  = cathodic peak potential

$i_{pa}$  = anodic peak current,  $i_{pc}$  = cathodic peak current

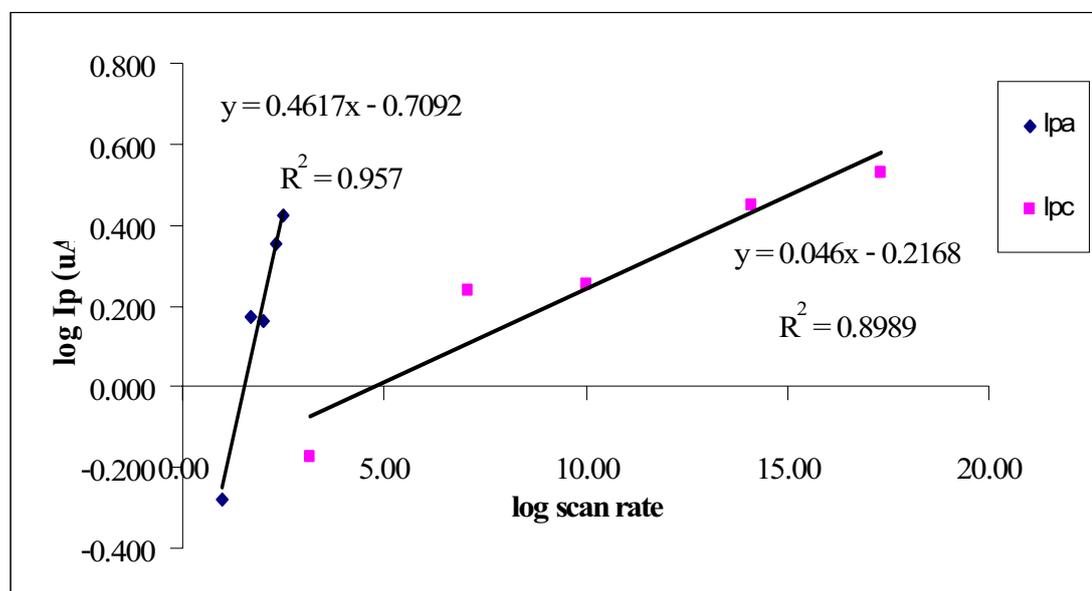
ตารางที่ 38 (A) ค่า  $(\text{Scan rate})^{1/2}$ ,  $E_{pc} - E_{pa}$  และ  $i_{pa}/i_{pc}$  จากการจัดการข้อมูล cyclic voltammogram สำหรับศึกษาผลของ scan rate

$(\text{Scan rate})^{1/2}$	$\Delta E_p^*$ (V vs Ag/AgCl)	$i_{pa}/i_{pc}$ ( $\mu$ A)
3.16	0.084	0.777
7.07	0.091	0.855
10.0	0.095	0.821
14.1	0.101	0.804
17.3	0.106	0.780

$$*\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}|$$



รูปที่ 43 พล็อตระหว่าง  $i_{pa}$ ,  $i_{pc}$  กับ  $(\text{Scan rate})^{1/2}$  จาก cyclic voltammogram ของ 1.68 mM  $\text{ABTS}^{\bullet}$  radical ใน phosphate buffer pH 7.0



รูปที่ 44 พล็อตระหว่าง  $\log(i_{pa})$ ,  $\log(i_{pc})$  กับ  $\log(\text{Scan rate})$  จาก cyclic voltammogram ของ 1.68 mM  $\text{ABTS}^{\bullet}$  radical ใน phosphate buffer pH 7.0

จากกราฟแสดงการพลอตระหว่าง  $i_p$  กับ  $(\text{Scan rate})^{1/2}$  พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ซึ่งสอดคล้องกับสมการ Randles-Sevcik ดังนี้ [16]

$$i_p = 2.69 \times 10^{-5} n^{3/2} A D^{1/2} C V^{1/2} \quad (3)$$

เมื่อพิจารณาค่า  $\Delta E_p$  ซึ่งค่านี้สามารถบอกได้ว่าปฏิกิริยาที่ทดลองนั้นเป็นปฏิกิริยาแบบ reversible หรือไม่ โดยถ้าเป็นปฏิกิริยา reversible ค่า  $\Delta E_p$  ต้องมีค่าประมาณ 0.059 V สำหรับปฏิกิริยาที่มีอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้อง 1 อิเล็กตรอน จากตารางที่ 38 (A) ค่า  $\Delta E_p$  อยู่ในช่วง 0.080-0.106 V ดังนั้นปฏิกิริยาของ  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  radical จึงเป็นแบบ quasi reversible [34]

กราฟแสดงการพลอตระหว่าง  $\log(i_{pa})$  กับ  $\log(\text{scan rate})$  เป็นสมการเส้นตรง แสดงว่ากระแสที่เกิดขึ้นเป็นกระแสที่ถูกควบคุมจากการแพร่ (diffusion controll current) [36]

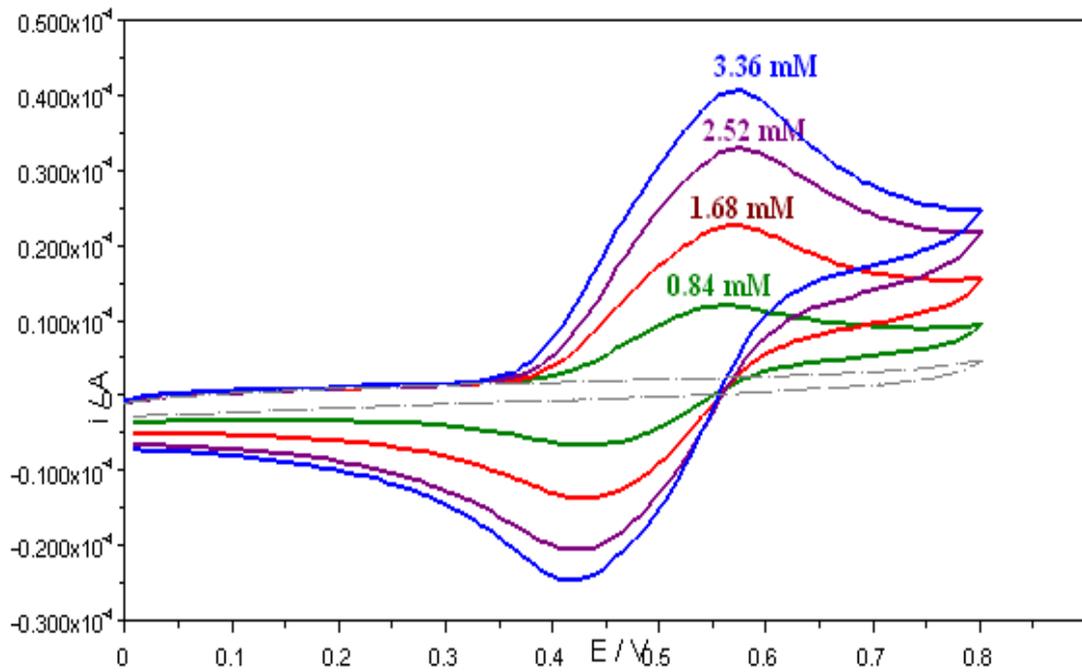
### 3.5.1.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radical ต่อ cyclic

#### voltammogram

##### วิธีการทดลอง

1. เตรียมผิวขั้วใช้งานโดยทำ pretreatment GCE ตามหัวข้อ 3.2.1
2. บันทึก cyclic voltammogram ของ 0.84, 1.68, 2.52, 3.36 mM  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  radical ใน phosphate buffer pH 7.0 โดยใช้ scan rate 100 mV/s และใช้สภาวะต่างๆของการทดลองตามข้อ 3.5.1.2 ลักษณะของ cyclic voltammogram แสดงดังรูป 45 ค่า peak potential และ peak current แสดงดังตาราง 39
3. พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  radical และ peak current ( $i_p$ ) แสดงดังรูปที่ 46

## ผลการทดลอง



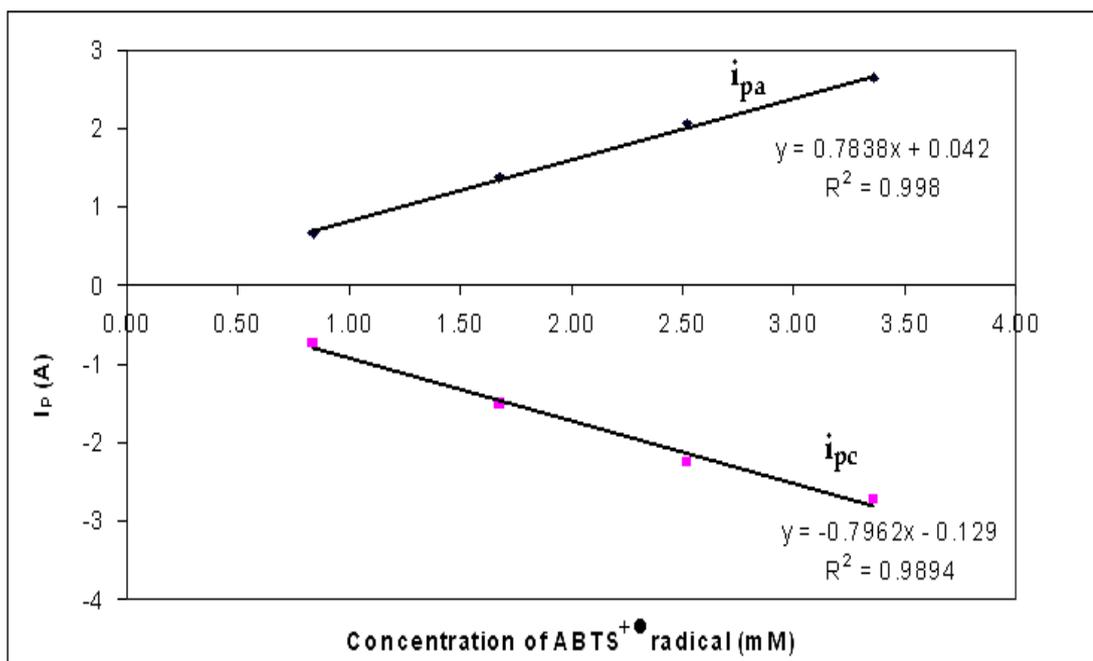
รูปที่ 45 Cyclic voltammogram ของ  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  radical ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0

ตารางที่ 39 ค่า peak potential และ peak current จาก cyclic voltammogram ของ  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  radical ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน phosphate buffer pH 7.0

Concentration $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radical (mM)	$E_{pa}$ (V vs. Ag/AgCl)	$i_{pa}$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_{pc}$ (V vs. Ag/AgCl)	$i_{pc}$ ( $\mu\text{A}$ )	$i_{pa}/i_{pc}$ ( $\mu\text{A}$ )
0.84	0.548	0.67	0.452	-0.73	0.915
1.68	0.555	1.38	0.444	-1.51	0.913
2.52	0.563	2.06	0.436	-2.24	0.918
3.36	0.563	2.64	0.428	-2.72	0.971

$E_{pa}$  = anodic peak potential,  $E_{pc}$  = cathodic peak potential

$i_{pa}$  = anodic peak current,  $i_{pc}$  = cathodic peak current



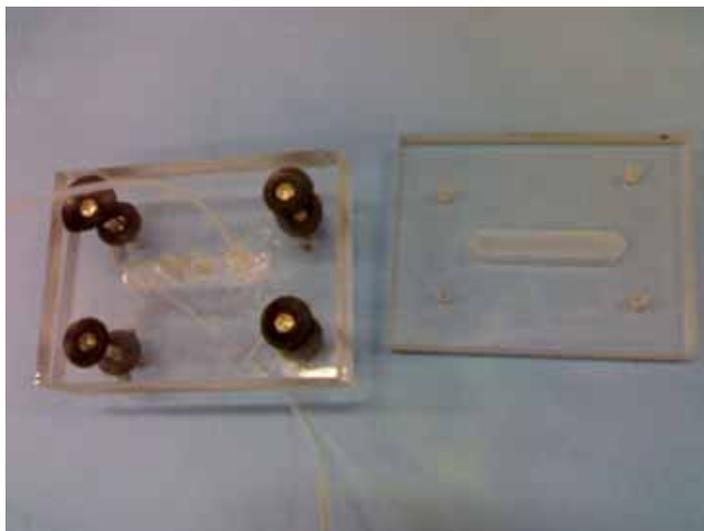
รูปที่ 46 Calibration curve ของ ABTS<sup>•+</sup> radical ใน phosphate buffer pH 7.0

จากตารางที่ 39 ค่า  $I_{pa}/I_{pc}$  มีค่าประมาณ 0.9 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 นั้นแสดงว่าปฏิกิริยาที่ขั้วของ ABTS<sup>•+</sup> radical นั้นเป็นแบบ quasi reversible และเมื่อพลอตค่า  $i_p$  กับ ABTS<sup>•+</sup> radical ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ calibration curve ของ ABTS<sup>•+</sup> radical ใน phosphate buffer pH 7.0 แสดงดังรูปที่ 46 พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงได้สมการเส้นตรง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณต่อไปได้

### 3.5.2 การประดิษฐ์เซลล์ตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้า (Electrochemical detector cell)

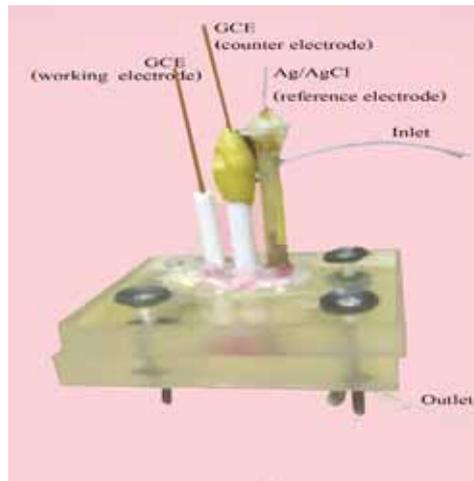
ตัดพลาสติกชนิดแผ่นใสอะคริลิก (acrylic sheet) ซึ่งมีความหนา 1.2 cm ให้ได้รูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาด 7 x 10 x 1.2 cm จำนวน 2 ชิ้น ชิ้นหนึ่งใช้เป็นส่วนบนและอีกชิ้นหนึ่งใช้เป็นส่วนล่าง สำหรับส่วนล่างจะเจาะตรงกลางแผ่นให้มีขนาด 1 x 6 cm ลึก 1.5 mm ได้ปริมาตรของ detector cell ขนาด 868  $\mu$ L และสำหรับแผ่นที่ใช้เป็นส่วนบนนำมาเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 mm สำหรับเสียบขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว โดยให้ตรงกับช่องปริมาตรเซลล์ที่อยู่ส่วนล่าง เมื่อเจาะทั้งสองส่วนเสร็จแล้วจึงนำทั้งสองส่วนมาประกบกันและเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ทะลุแผ่นบนและล่าง สำหรับใส่หลอด 4 ตัวเพื่อประกอบเป็นตัวเซลล์ จากนั้นเจาะรูสำหรับใส่ท่อเข้า (inlet) ที่แผ่นพลาสติกส่วนบน และท่อออก (outlet) ที่แผ่นพลาสติกส่วนล่าง โดยให้รูทั้งสองนั้นอยู่คนละด้านของช่องเซลล์ ใส่ microbore PTFE tubing เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.07 mm ให้ปลาย microbore

PTFE tubing ภายในช่องที่เป็นปริมาตรเซลล์เสมอกับผิวของแผ่นพลาสติกทั้งสองแผ่น หยอดกาวซิลิโคนที่โคนให้ microbore PTFE tubing ยึดติดกับแผ่นพลาสติกทั้งสองแผ่น ลักษณะของเซลล์ที่ได้แสดงดังรูปที่ 47



รูปที่ 47 ส่วนประกอบของเซลล์ตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้า

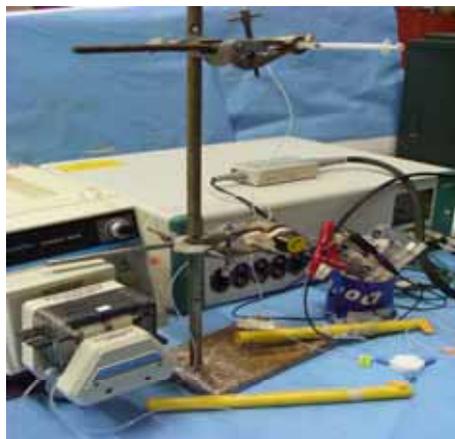
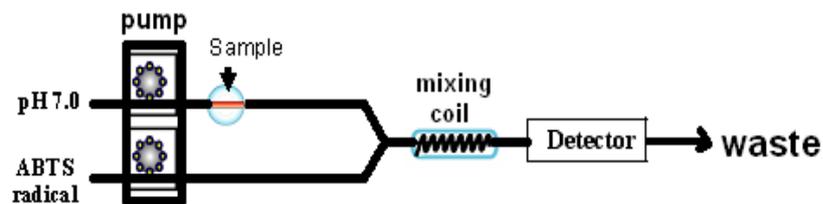
ขั้วไฟฟ้าที่ใช้สำหรับ ECD ประกอบไปด้วยขั้วใช้งานและขั้วประกอบ เป็น glassy carbon electrode (GCE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ glassy carbon เท่ากับ 3 mm และ ขั้วอ้างอิงเป็น Ag/AgCl (saturated KCl) เสียบขั้วทั้งสามที่แผ่นพลาสติกส่วนบนและประกอบเข้ากับแผ่นพลาสติกส่วนล่างด้วยนอตและประเก็นที่ทำด้วยแผ่นยางซิลิโคนให้แน่น ต่อท่อน้ำเข้าเข้ากับปลายของ mixing coil และท่อน้ำออกกับท่อน้ำทิ้งในระบบไหลต่อเนื่อง ลักษณะของเซลล์ที่ได้แสดงดังรูปที่ 48



รูปที่ 48 ลักษณะของเซลล์ตรวจวัดเชิงเคมีไฟฟ้าพร้อมขั้วไฟฟ้า

### 3.5.3 การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ สำหรับ FI-ECD

เตรียมเซลล์ ECD ตามข้อ 3.5.2 และจัดตั้งของ Flow Injection system ตามรูปที่ 3.35 ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสามของเซลล์ ECD โดยใช้โปรแกรมของเครื่อง Auto lab 30 ที่ใช้เป็น potentiostat และ recorder ด้วยเทคนิค Chronoamperometry (interval time > 0.1 s) โดยวัดกระแสจากปฏิกิริยารีดักชันของ  $\text{ABTS}^{\bullet}$  radical เทียบกับเวลา

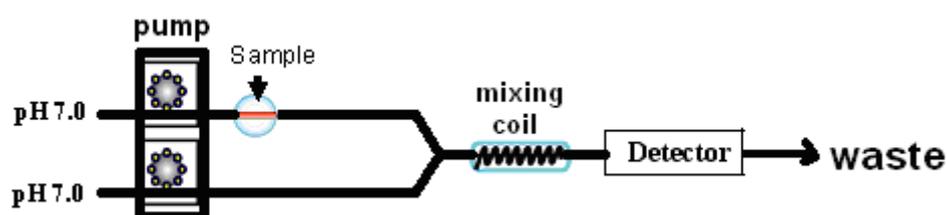


รูปที่ 49 (A) พัง (manifold) ของ Flow Injection system (B) อุปกรณ์ใน Flow Injection system

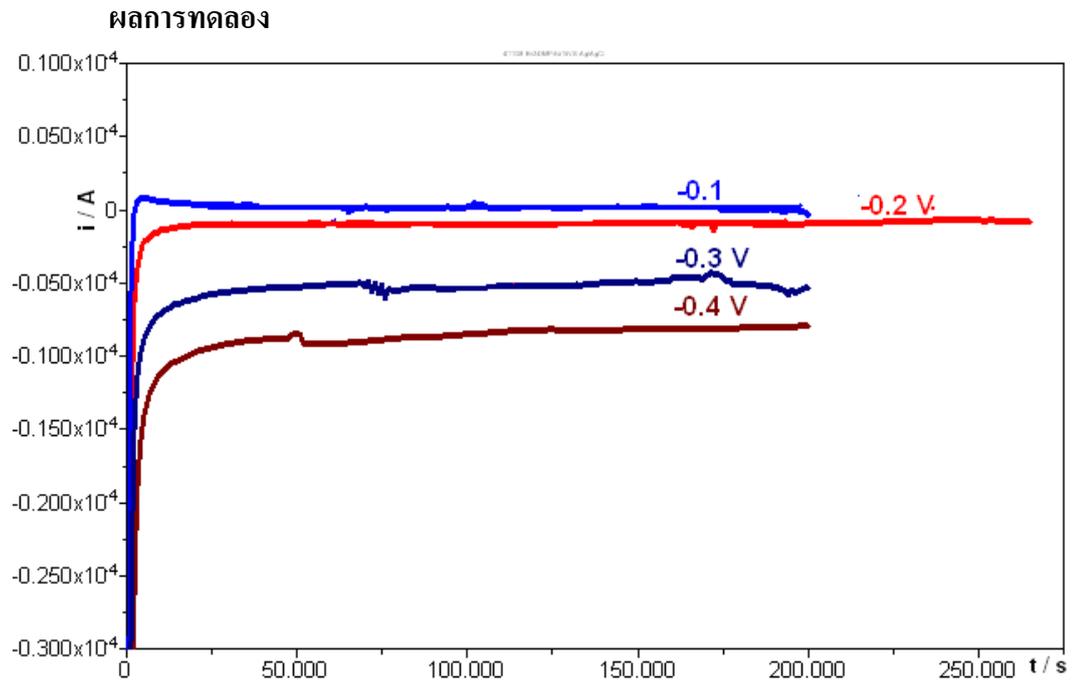
### 3.5.3.1 ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับ Amperometric detection

#### วิธีทดลอง

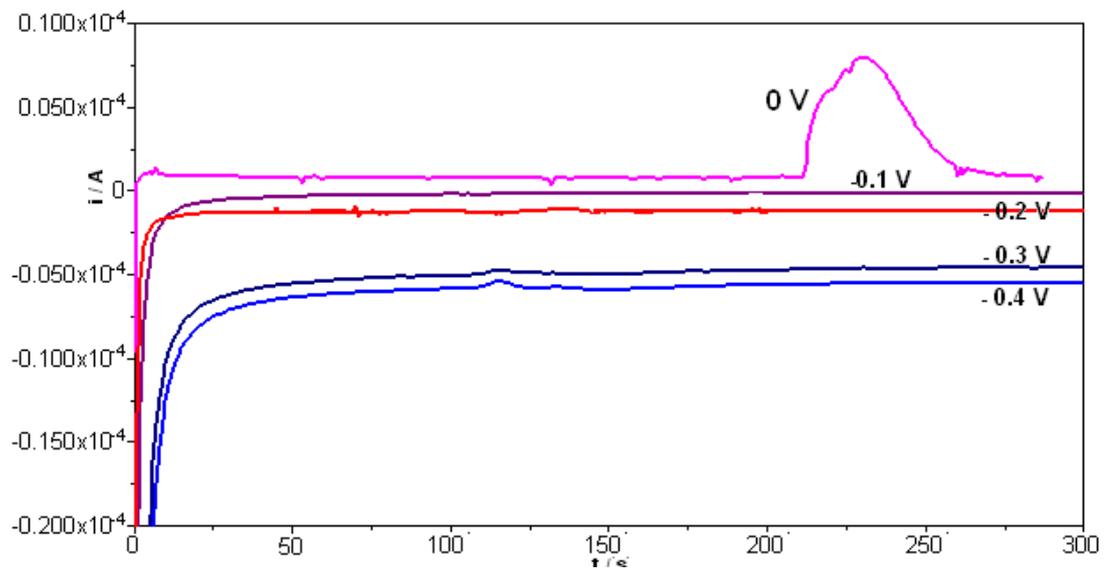
1. เตรียมเซลล์ตามข้อ 3.5.2 และจัดระบบ flow ตามผังในรูปที่ 49 ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min ความยาวของ reaction coil เท่ากับ 200 cm ความเข้มข้น  $\text{ABTS}^{\bullet}$  radical 0.10 mM เป็น reagent และ phosphate buffer pH 7.0 ทำหน้าที่เป็น carrier ทำการบันทึกค่ากระแสไฟฟ้าจากปฏิกิริยารีดักชันของ  $\text{ABTS}^{\bullet}$  radical เทียบกับเวลาด้วยโปรแกรม Chronoamperometry (interval time > 0.1 s) โดยการให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ ที่ 0, -0.1, -0.2, -0.3, -0.4 V สัญญาณกระแสไฟฟ้าที่ได้แสดงดังรูป 50
2. จัดระบบ flow ตามผังในรูปที่ 51 โดยฉีดสารมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อตรวจสอบสัญญาณกระแสไฟฟ้าของ gallic acid ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 52



รูปที่ 51 ผัง (manifold) ของ Flow Injection system สำหรับศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้า



รูปที่ 50 สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ระบบ flow เมื่อให้ค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ต่างกันและยังไม่มีสารฉีดตัวอย่าง



รูปที่ 52 สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ระบบ flow เมื่อให้ค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ต่างกันและมีการฉีด gallic acid

ในรูป 50 พบว่าสัญญาณกระแสไฟฟ้าจากปฏิกิริยารีดักชันของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical จะเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นลบมากขึ้น และเมื่อพิจารณาจาก cyclic voltammogram ของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical มีปฏิกิริยา quasi reversible โดยให้ค่า  $E_{pc} = 0.46 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ,  $E_{pa} = 0.55 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  สารมาตรฐาน gallic acid มีปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบผันกลับไม่ได้ ณ ตำแหน่ง  $E_{pa} = 0.24 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  และสารสกัดจากจึงมีปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบผันกลับไม่ได้ ณ ค่า  $E_{pa} = 0.44 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  เมื่อใช้ตัวกลางเป็น phosphate buffer pH 7.0 ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนจากสัญญาณของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจึงเลือกศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ ECD เฉพาะในด้านลบ ในช่วง  $0 - (-0.4) \text{ V vs. Ag/AgCl}$  เนื่องจากการทดลองในระบบ flow จะใช้สัญญาณกระแสไฟฟ้าจากปฏิกิริยารีดักชันของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical เพียงอย่างเดียว และจากรูป 52 พบว่าที่ศักย์ไฟฟ้าที่  $0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  นั้น มีสัญญาณกระแสไฟฟ้าจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารมาตรฐาน gallic acid เกิดขึ้นได้ ดังนั้นจึงเลือกค่าศักย์ไฟฟ้า  $-0.1 \text{ V}$  เป็นศักย์ไฟฟ้าที่จะให้แก่ ECD สำหรับการทดลองในระบบ FI-ECD ต่อไป

### 3.5.3.2 ผลของความเข้มข้นของ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical

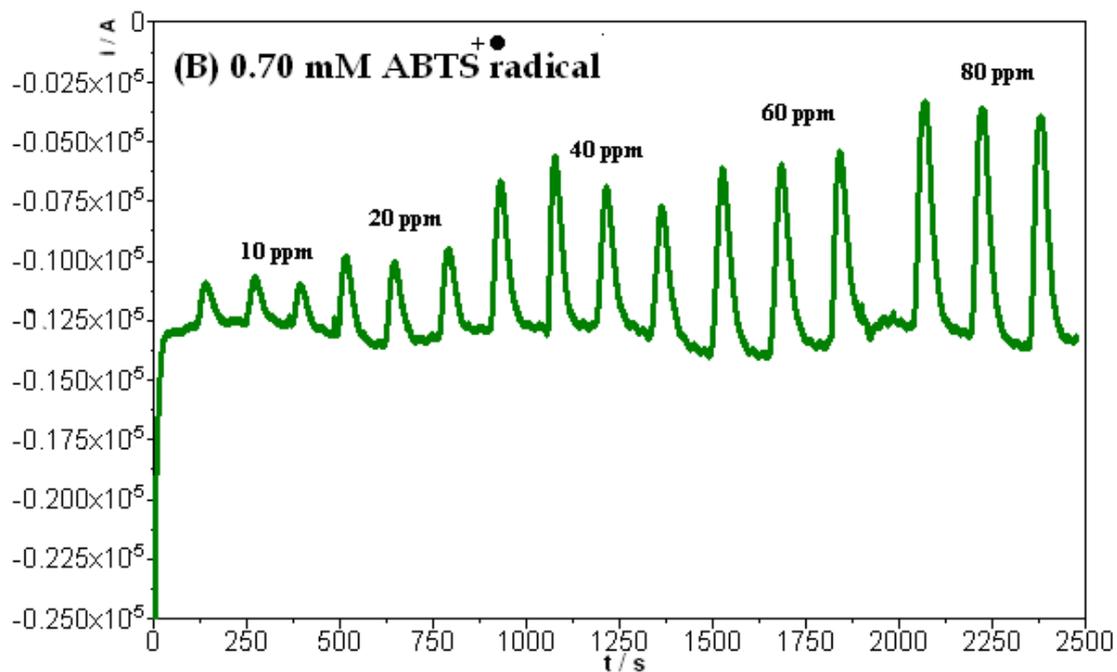
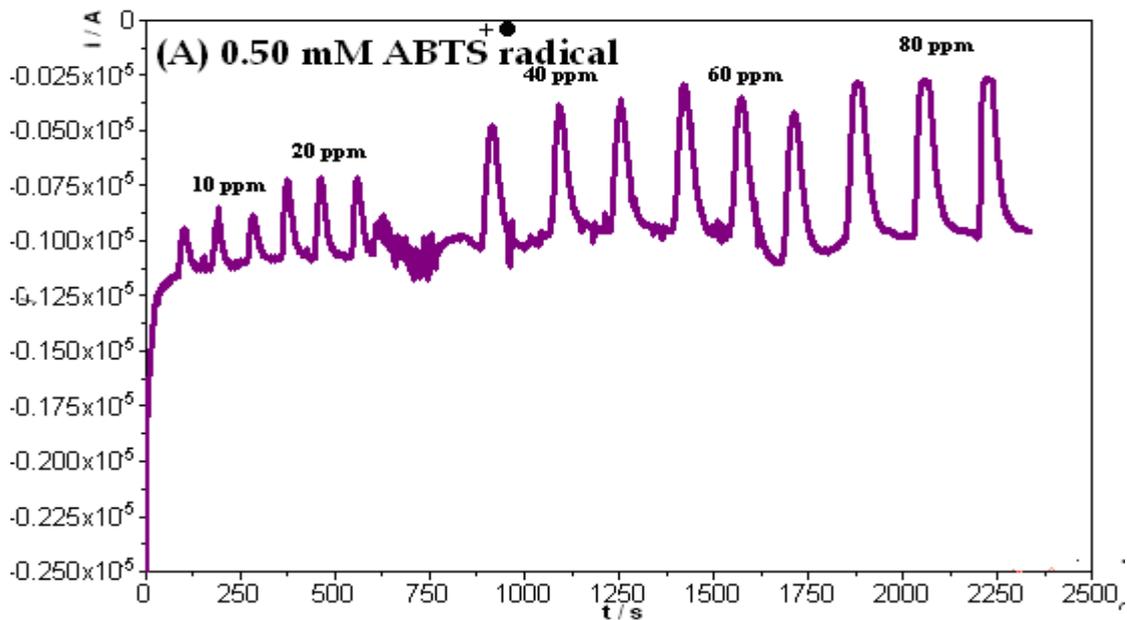
#### วิธีทดลอง

1. เตรียมเซลล์ตามข้อ 3.5.2 และจัดระบบ flow ตามผังในรูปที่ 49 ทำการบันทึกโดยใช้เทคนิค chronoamperometric และตั้งสภาวะการทดลองโดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ  $1.5 \text{ mL/min}$ , ความยาวของ reaction coil เท่ากับ  $200 \text{ cm}$  ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ detector cell  $-0.1 \text{ V vs Ag/AgCl}$ , ความเข้มข้น  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical  $0.50 \text{ mM}$  เป็น reagent และ phosphate buffer pH 7.0 ทำหน้าที่เป็น carrier จากนั้นทำการ load และ inject สารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 ppm ตามลำดับความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 53 (A)

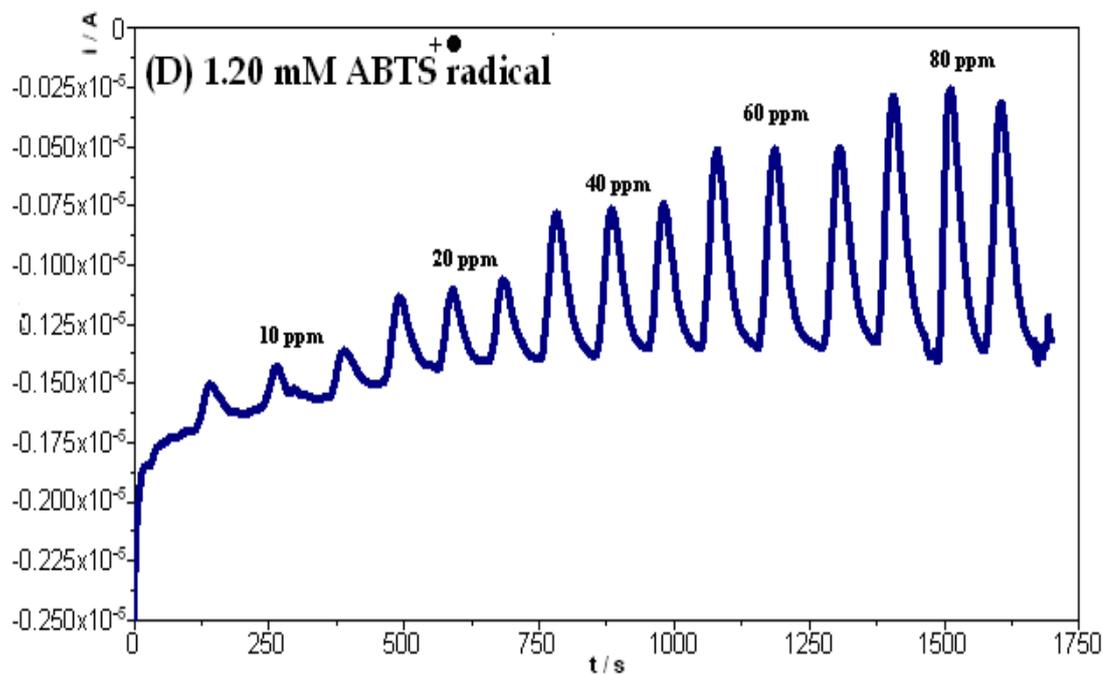
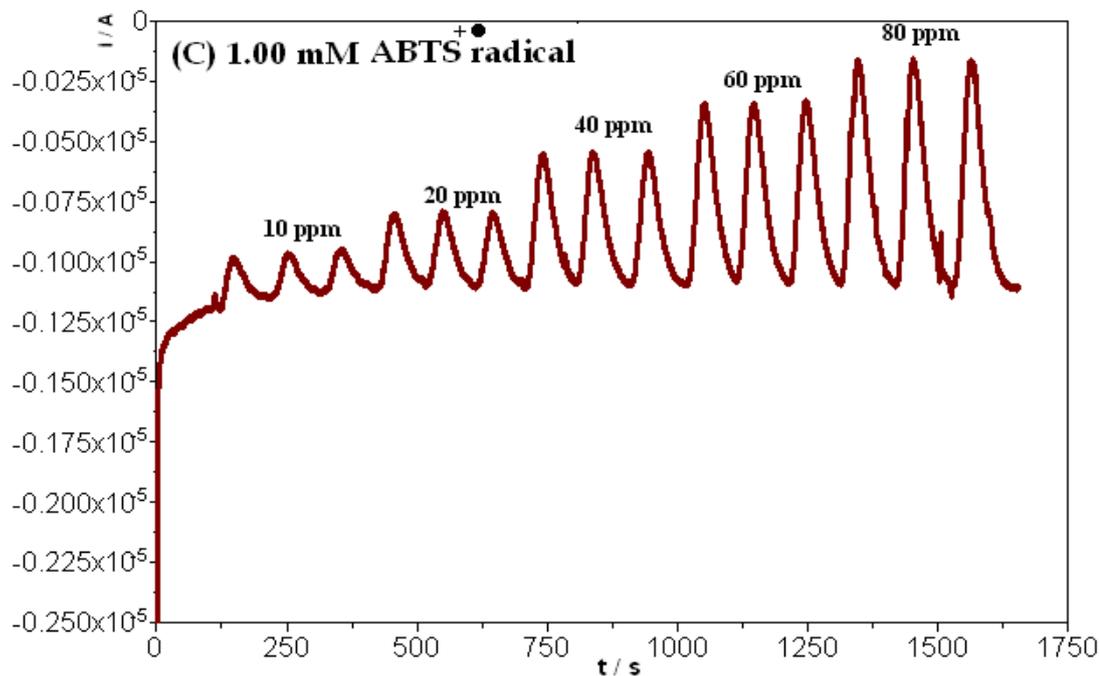
2. ทำการทดลองตามข้อ 1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical เป็น  $0.70 \text{ mM}$ ,  $1.00 \text{ mM}$  และ  $1.20 \text{ mM}$  ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 53 (B-D)

3. วัดความสูงของพีคซึ่งเกิดจากการลดลงของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical หลังจากทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 40 จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานโดยการพลอตค่าความสูงของพีคกับความเข้มข้นของ gallic acid เมื่อใช้ความเข้มข้นของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical ต่างกัน ได้ผลแสดงในรูปที่ 54 และแสดงค่าของความชันและค่า  $R^2$  ของกราฟในรูปที่ 54 แสดงดังตารางที่ 41

## ผลการทดลอง



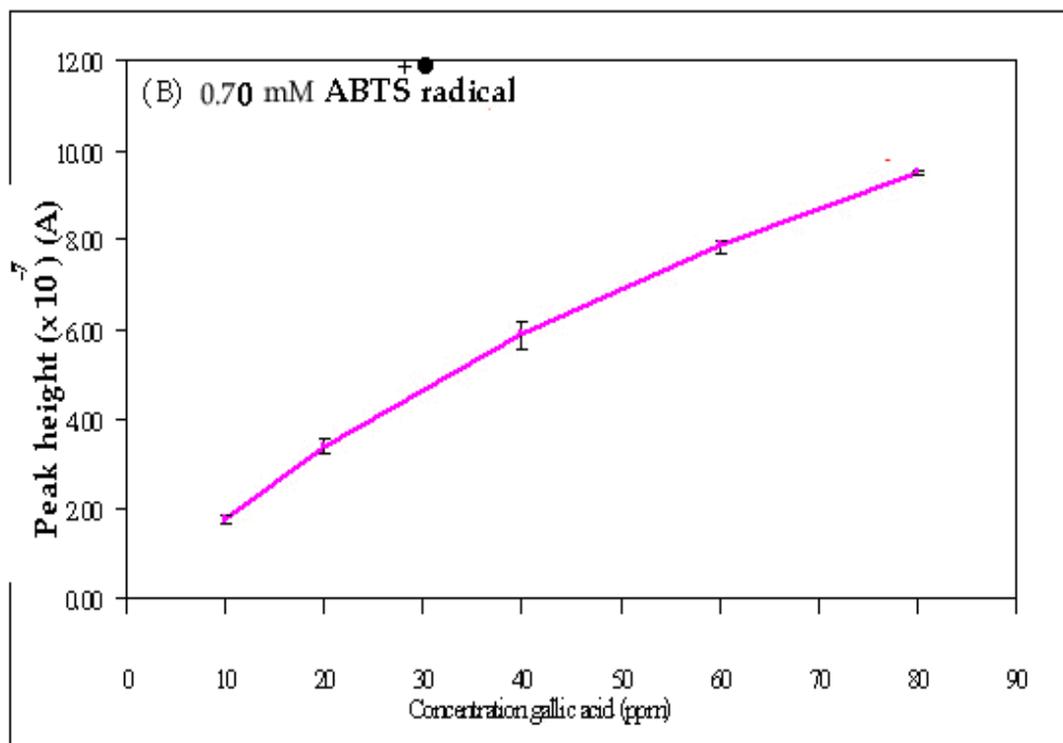
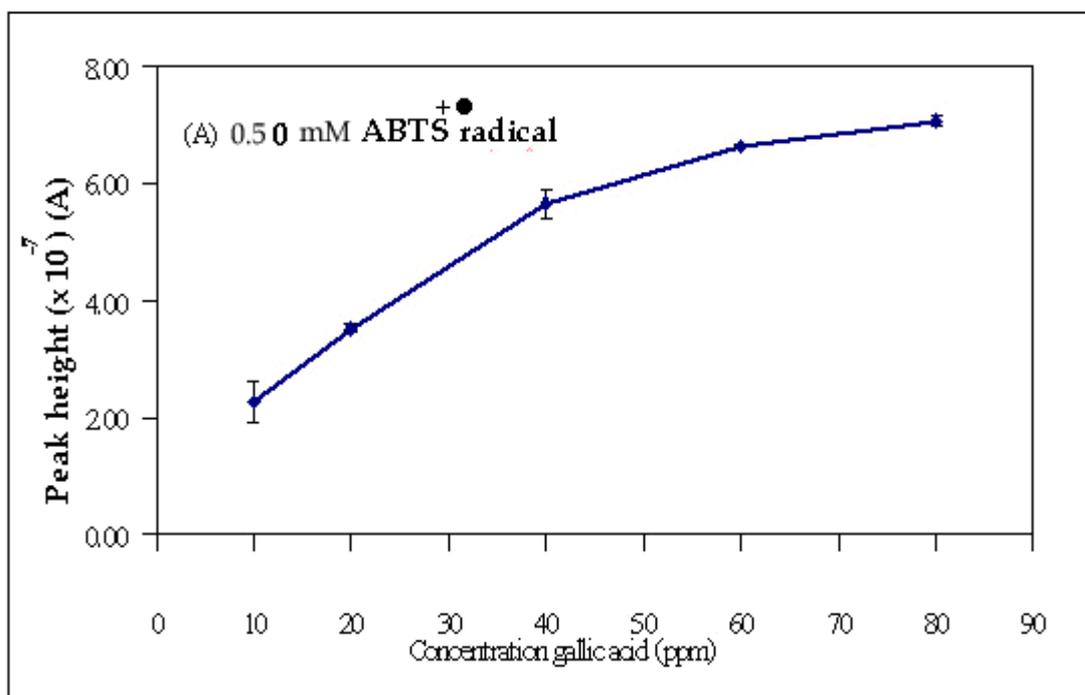
รูปที่ 53 สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น ในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS<sup>+</sup> radical เป็น (A) 0.50, (B) 0.70, (C) 1.00 และ (D) 1.20 mM



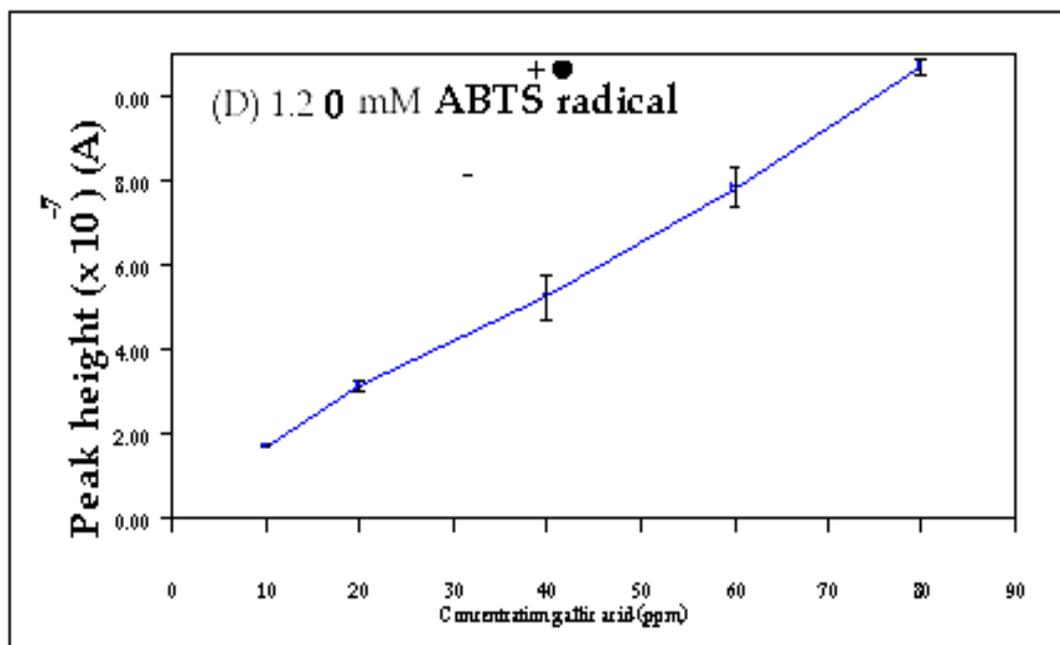
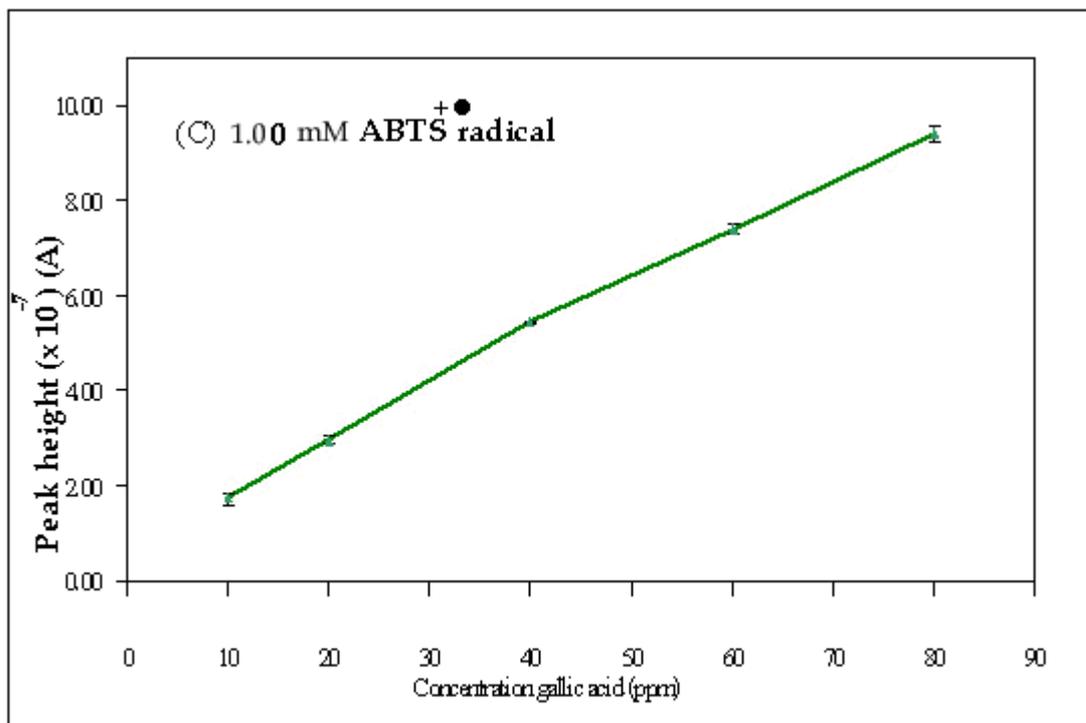
รูปที่ 53 (ต่อ) สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS<sup>+</sup> radical เป็น (A) 0.50, (B) 0.70, (C) 1.00 และ (D) 1.20 mM

ตารางที่ 40 ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS<sup>•+</sup> radical เป็น 0.50 - 1.20 mM

Concentration of ABTS <sup>•+</sup> radical (mM)	Concentration of gallic acid (ppm)	Peak height ( $\times 10^{-7}$ ) (A)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean	SD
0.50	10	2.03	2.66	2.07	2.25	0.35
	20	3.49	3.58	3.52	3.53	0.05
	40	5.34	5.79	5.80	5.65	0.26
	60	6.68	6.66	6.59	6.64	0.05
	80	7.16	7.02	7.05	7.08	0.08
0.70	10	1.71	1.87	1.74	1.77	0.08
	20	3.34	3.26	3.56	3.38	0.16
	40	6.14	5.89	5.57	5.87	0.29
	60	7.72	7.82	7.96	7.83	0.12
	80	9.44	9.54	9.51	9.50	0.06
1.00	10	1.88	1.72	1.63	1.74	0.12
	20	2.88	3.00	3.04	2.97	0.08
	40	5.44	5.42	5.43	5.43	0.01
	60	7.40	7.30	7.48	7.39	0.09
	80	9.23	9.47	9.51	9.41	0.15
1.20	10	1.68	1.73	1.71	1.71	0.02
	20	3.28	3.10	3.13	3.17	0.10
	40	4.72	5.77	5.21	5.23	0.52
	60	7.33	7.96	8.24	7.84	0.46
	80	10.47	10.83	10.84	10.71	0.21



รูปที่ 54 Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS<sup>+</sup> radical เป็น (A) 0.50, (B) 0.70, (C) 1.00 และ (D) 1.20 mM



รูปที่ 54 (ต่อ) Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ABTS<sup>+</sup> radical เป็น (A) 0.50, (B) 0.70, (C) 1.00 และ (D) 1.20 mM

ตารางที่ 41 ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า  $R^2$  เมื่อใช้ความเข้มข้นของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical ต่างกัน

Concentration of ABTS radical (mM)	สมการเส้นตรง	$R^2$
0.50	$y = 0.0694x + 2.1145$	0.9205
0.70	$y = 0.1095x + 1.0724$	0.9877
1.00	$y = 0.1093x + 0.7998$	0.9972
1.20	$y = 0.1261x + 0.4383$	0.9968

จากตารางที่ 41 ในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid 10 – 80 ppm สมการความเป็นเส้นตรงนั้นมีแนวโน้มให้ค่า slope และค่า  $R^2$  มากขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้น  $ABTS^{+\bullet}$  radical มากขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 1.00 mM ของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical นั้นให้ค่า  $R^2$  มากที่สุดคือ 0.9972 และเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 3.40 นั้นจะเห็นว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณความสูงของพีคจาก gallic acid แต่ละความเข้มข้นมีค่าน้อยที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical เป็น 1.0 mM ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้กับการทดลองต่อไป

### 3.5.3.3 ผลของอัตราการไหล (Flow rate)

#### วิธีทดลอง

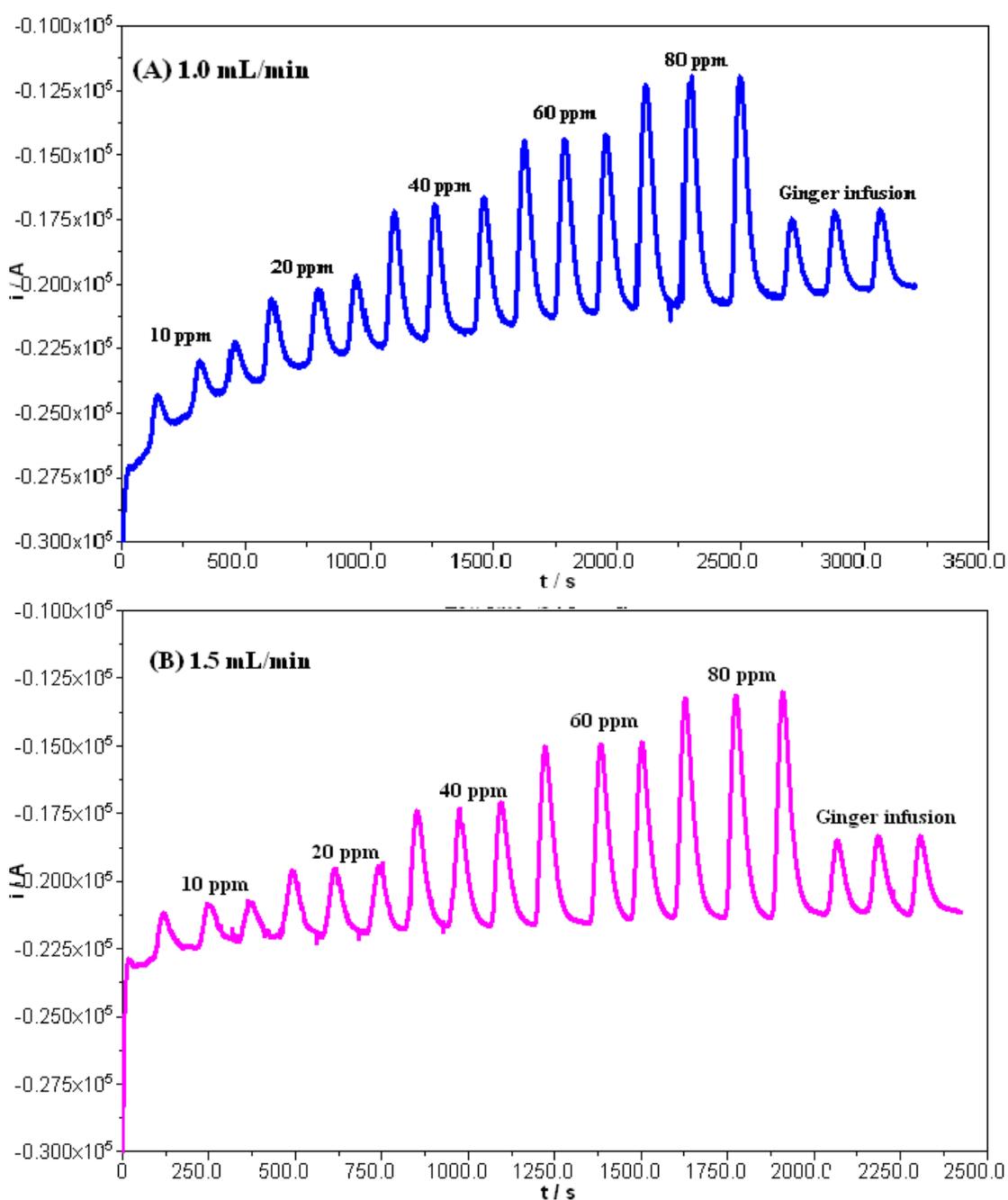
1. เตรียมเซลล์ตามข้อ 3.5.2 และจัดระบบ flow ตามผังในรูปที่ 49 ทำการบันทึกโดยใช้เทคนิค chronoamperometric และตั้งสภาวะการทดลองโดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 mL/min, ความยาวของ reaction coil เท่ากับ 200 cm ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ detector cell  $-0.1$  V vs Ag/AgCl,  $ABTS^{+\bullet}$  radical 1.00 mM เป็น reagent และ phosphate buffer pH 7.0 ทำหน้าที่เป็น carrier จากนั้นทำการ load และ inject สารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 10 - 80 ppm ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 55 (A)

2. ทำการทดลองตามข้อ 1 แต่เปลี่ยนอัตราการไหลเป็น 1.5, 2.2, และ 2.6 mL/min ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 55 (B-D)

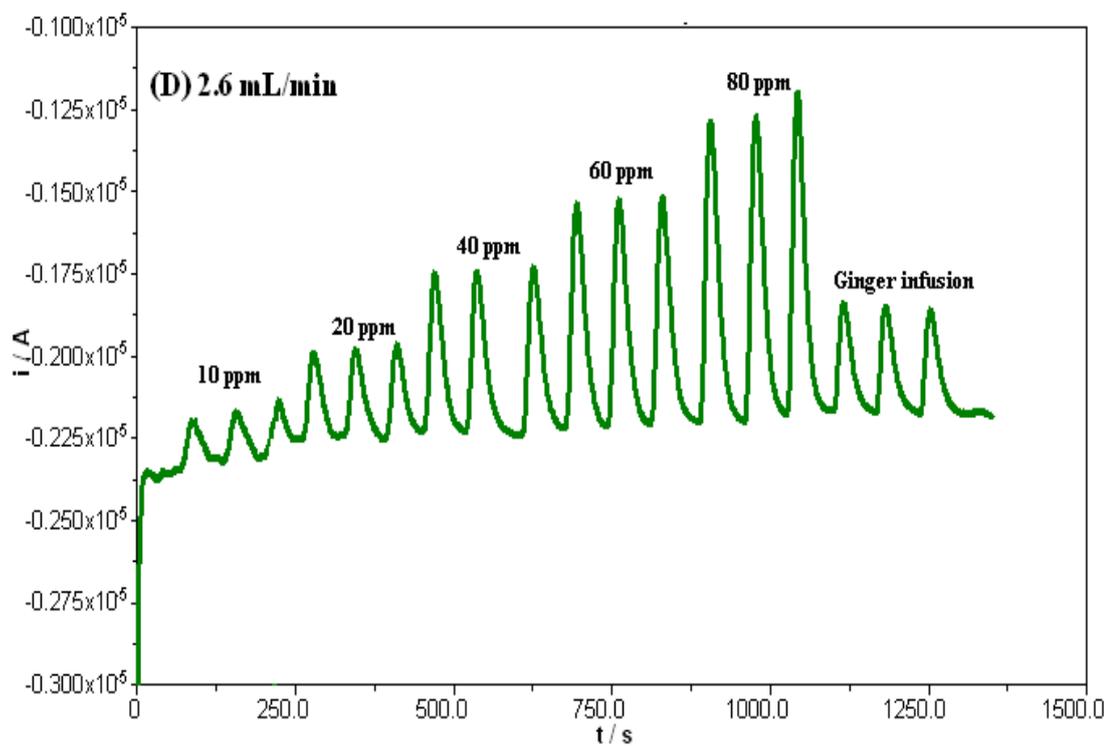
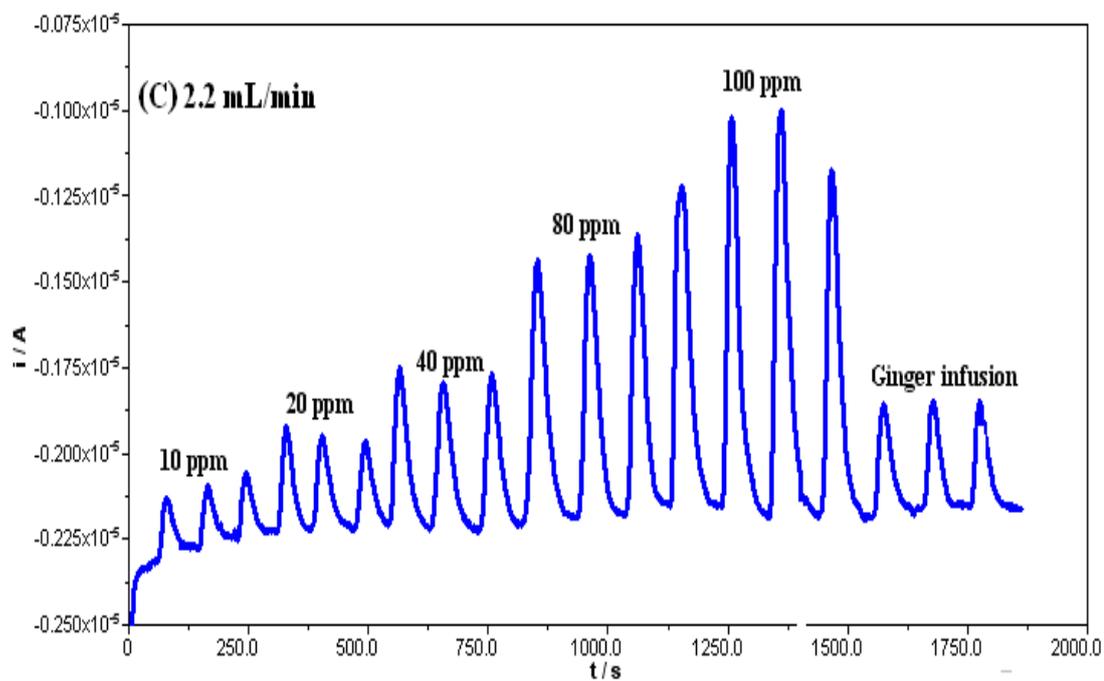
3. วัดความสูงของพีคซึ่งเกิดจากการลดลงของ  $ABTS^{+\bullet}$  radical หลังจากทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 42 จากนั้นทำการพลอตค่าความสูงของพีคที่แต่ละความ

เข้มข้นของ gallic acid เมื่อใช้อัตราการไหลต่างกัน แสดงในกราฟมาตรฐานรูปที่ 56 (A-D) และแสดงสมการเส้นตรงและค่า  $R^2$  สรุปผลในตารางที่ 43

#### ผลการทดลอง



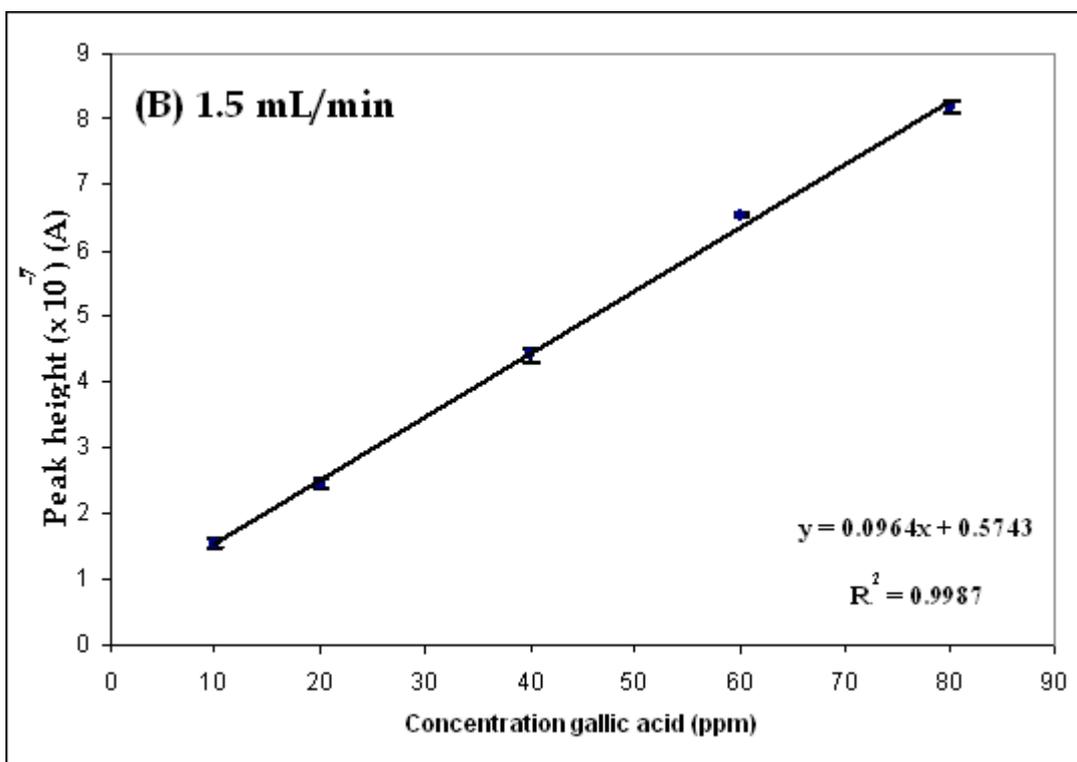
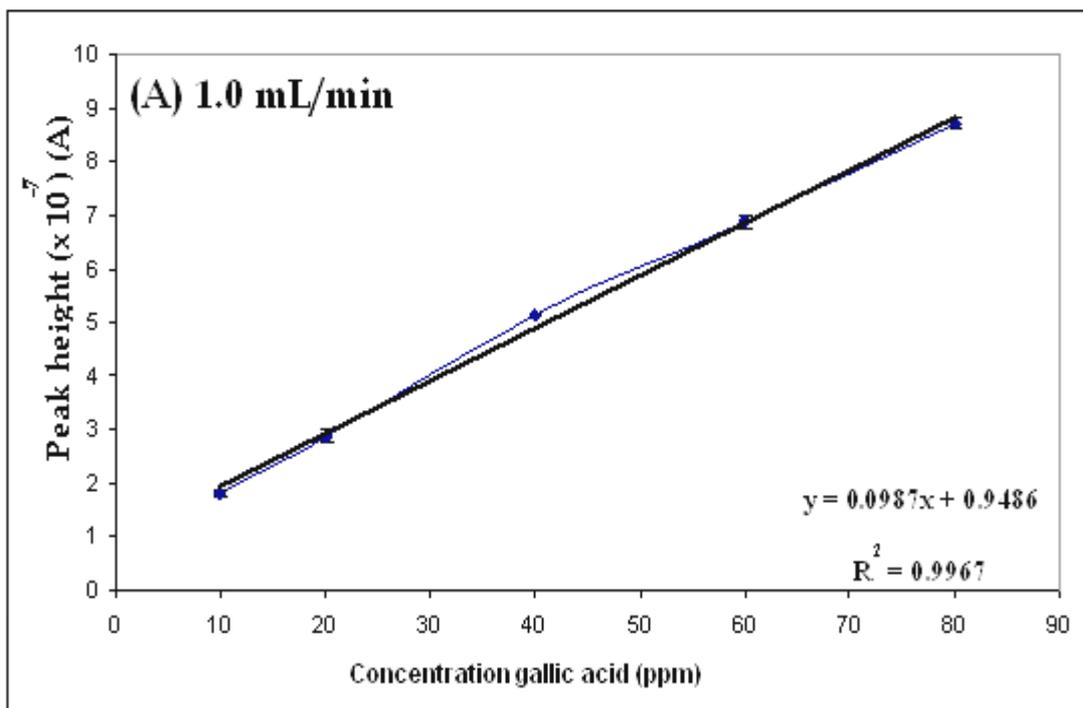
รูปที่ 55 สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้อัตราการไหลเท่ากับ (A) 1.0, (B) 1.5, (C) 2.2, (D) 2.6 mL/min



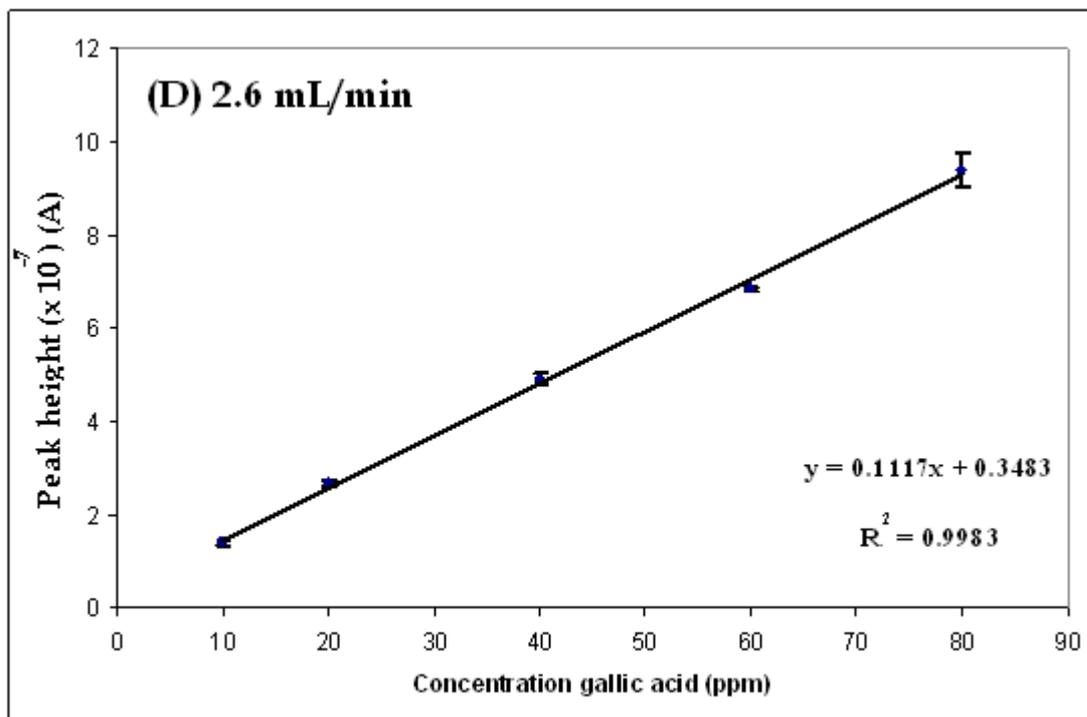
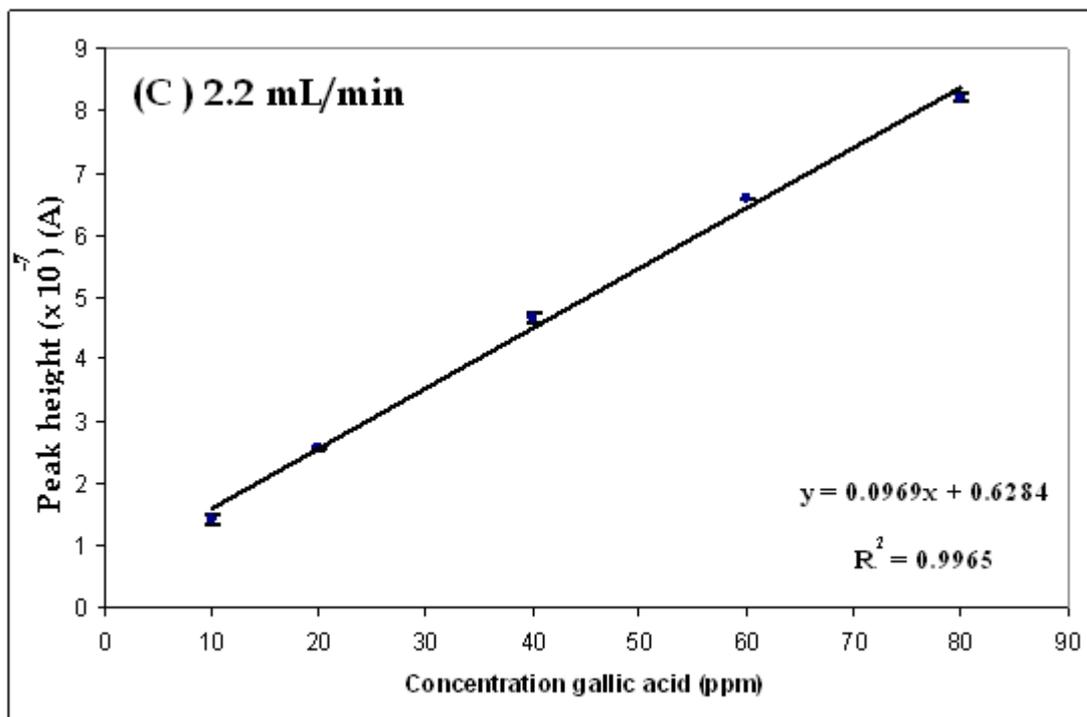
รูปที่ 55 (ต่อ) สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้อัตราการไหลเท่ากับ (A) 1.0, (B) 1.5, (C) 2.2 , (D) 2.6 mL/min

ตารางที่ 42 ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้อัตราการไหล (flow rate) ที่แตกต่างกัน

Flow rate (mL/min)	Concentration of gallic acid (ppm)	Peak height ( $\times 10^{-7}$ ) (A)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean	SD
1.0	10	1.82	1.86	1.75	1.81	0.06
	20	2.99	2.77	2.89	2.88	0.11
	40	5.13	5.17	5.19	5.16	0.03
	60	7.04	6.83	6.82	6.90	0.12
	80	8.61	8.81	8.72	8.71	0.10
1.5	10	1.62	1.55	1.47	1.55	0.08
	20	2.37	2.48	2.51	2.45	0.07
	40	4.33	4.35	4.54	4.41	0.12
	60	6.50	6.56	6.50	6.52	0.03
	80	8.11	8.20	8.26	8.19	0.08
2.2	10	1.53	1.35	1.43	1.44	0.09
	20	2.57	2.62	2.57	2.59	0.03
	40	4.59	4.64	4.77	4.67	0.09
	60	6.58	6.60	6.59	6.59	0.01
	80	8.22	8.26	8.12	8.20	0.07
2.6	10	1.34	1.38	1.47	1.40	0.07
	20	2.58	2.66	2.76	2.67	0.09
	40	4.77	4.89	5.03	4.90	0.13
	60	6.82	6.86	6.87	6.85	0.03
	80	9.12	9.24	9.77	9.38	0.35



รูปที่ 56 Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้อัตราการไหลต่างกัน (A) 1.0, (B) 1.5, (C) 2.2, (D) 2.6 mL/min



รูปที่ 56 (ต่อ) Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้อัตราการไหลต่างกัน (A) 1.0, (B) 1.5, (C) 2.2, (D) 2.6 mL/min

ตารางที่ 43 ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า  $R^2$  เมื่อใช้อัตราการไหลต่างกัน

Flow rate (mL/min)	สมการเส้นตรง	$R^2$
1.0	$y = 0.0987x + 0.9486$	0.9967
1.5	$y = 0.0964x + 0.5743$	0.9987
2.2	$y = 0.0969x + 0.6284$	0.9965
2.6	$y = 0.1117x + 0.3483$	0.9983

จากตารางที่ 43 ในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid 10 – 80 ppm ให้สมการความเป็นเส้นตรงสำหรับทุกอัตราการไหลมีค่า  $R^2$  ใกล้เคียงกันคือมีค่าประมาณ 0.99 แสดงว่าอัตราการไหลมีผลน้อย แต่เนื่องจากถ้าใช้อัตราการไหลมากก็จะส่งผลให้สิ้นเปลือง  $ABTS^{\bullet+}$  radical มาก ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการไหลที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในระบบ FI-ECD คือ 1.5 mL/min

### 3.5.3.4 ผลของ Reaction coil length

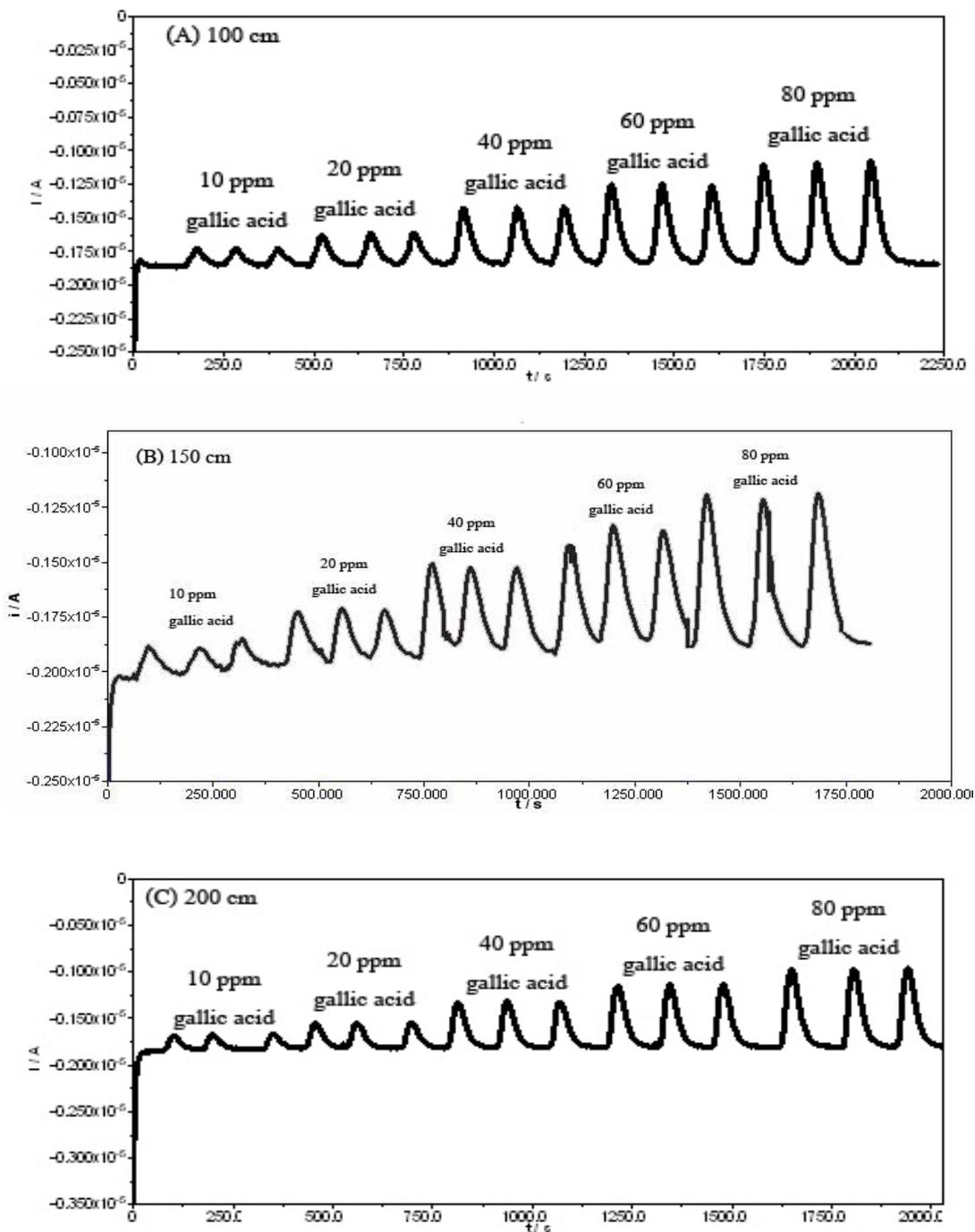
#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมเซลล์ตามข้อ 3.5.2 และจัดระบบ flow ตามผังในรูปที่ 49 ทำการบันทึกโดยใช้เทคนิค chronoamperometric และตั้งสถานะการทดลองโดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min, ความยาวของ reaction coil เท่ากับ 100 cm, ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ detector cell -0.1 V vs Ag/AgCl,  $ABTS^{\bullet+}$  radical 1.00 mM ซึ่งใช้เป็น reagent และ phosphate buffer pH 7.0 ทำหน้าที่เป็น carrier จากนั้นทำการ load และ inject สารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 10 - 80 ppm ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 57 (A)

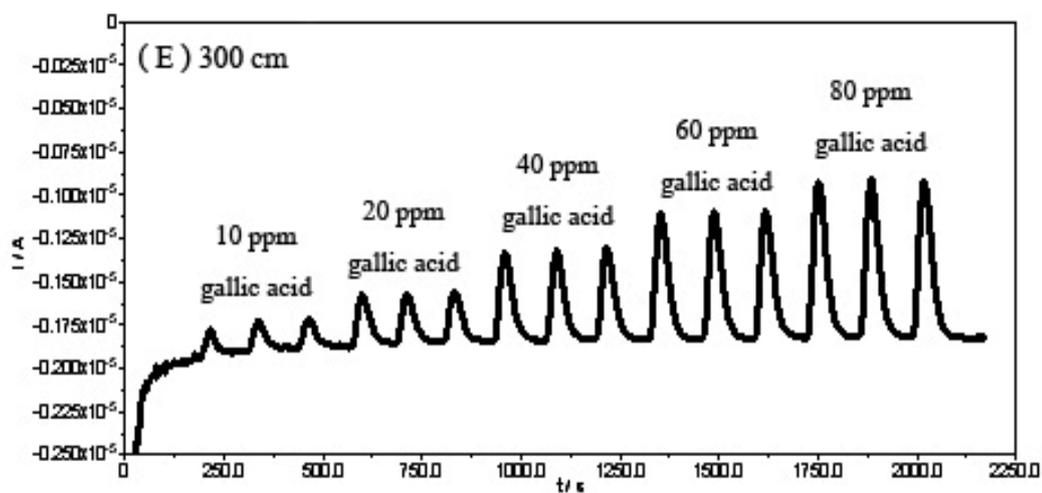
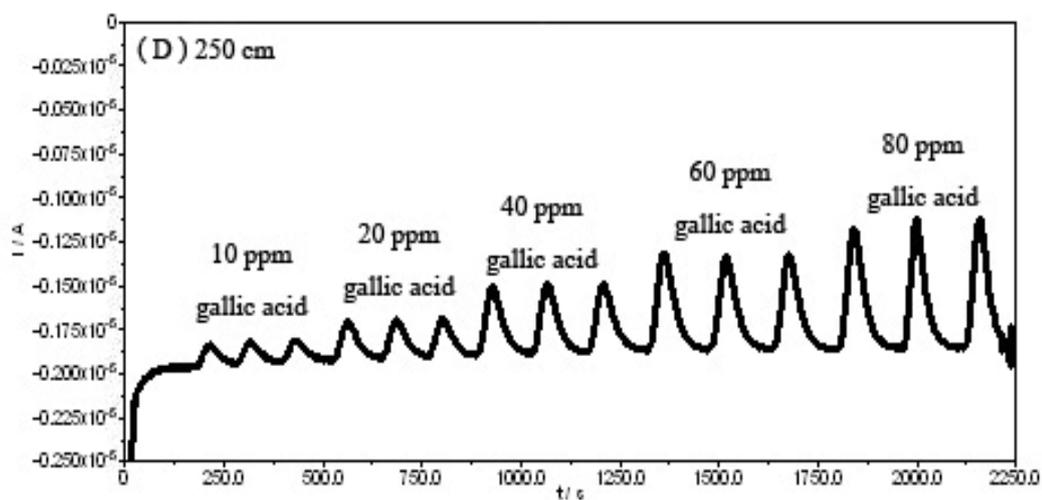
2. ทำการทดลองตามข้อ 1 แต่เปลี่ยนความยาวของ reaction coil เป็น 150, 200, 250 และ 300 cm ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 57 (B-E)

3. วัดความสูงของพีคซึ่งเกิดจากการลดลงของ  $ABTS^{\bullet+}$  radical หลังจากทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 44 จากนั้นทำการพลอตค่าความสูงของพีคกับความเข้มข้นของ gallic acid เมื่อความยาวของ reaction coil ต่างกันดังแสดงในกราฟมาตรฐานรูปที่ 58 (A-E) และแสดงลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า  $R^2$  ในรูป 58 สรุปผลในตารางที่ 45

## ผลการทดลอง



รูปที่ 57 สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ความยาวของ reaction coil ต่างๆ คือ (A) 100, (B) 150, (C) 200, (D) 250 และ (E) 300 cm



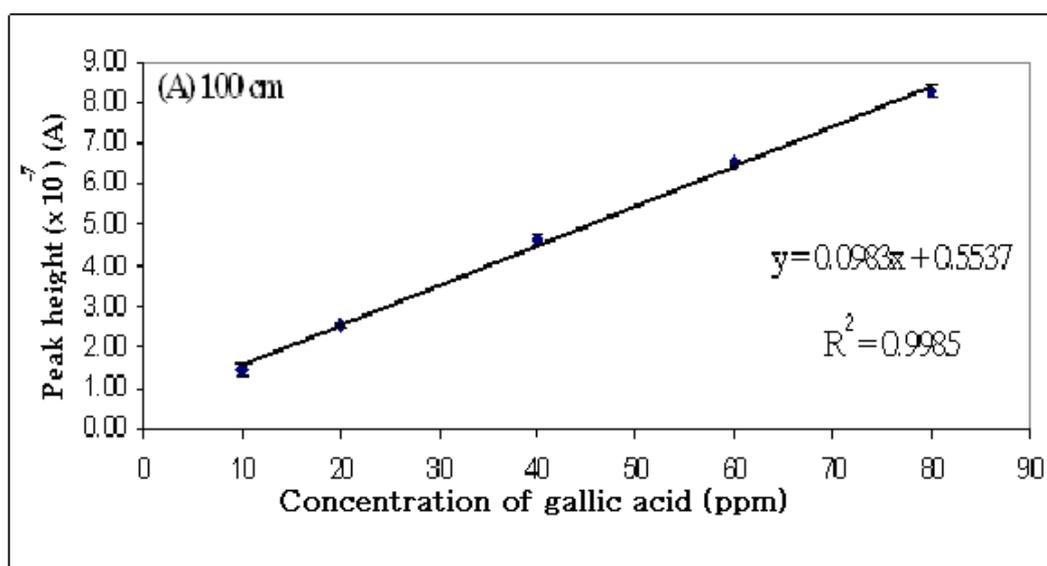
รูปที่ 57 (ต่อ) สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ความยาวของ reaction coil ต่างๆ คือ (A) 100, (B) 150, (C) 200, (D) 250 และ (E) 300 cm

ตารางที่ 44 ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้ ความยาวของ reaction coil แตกต่างกัน

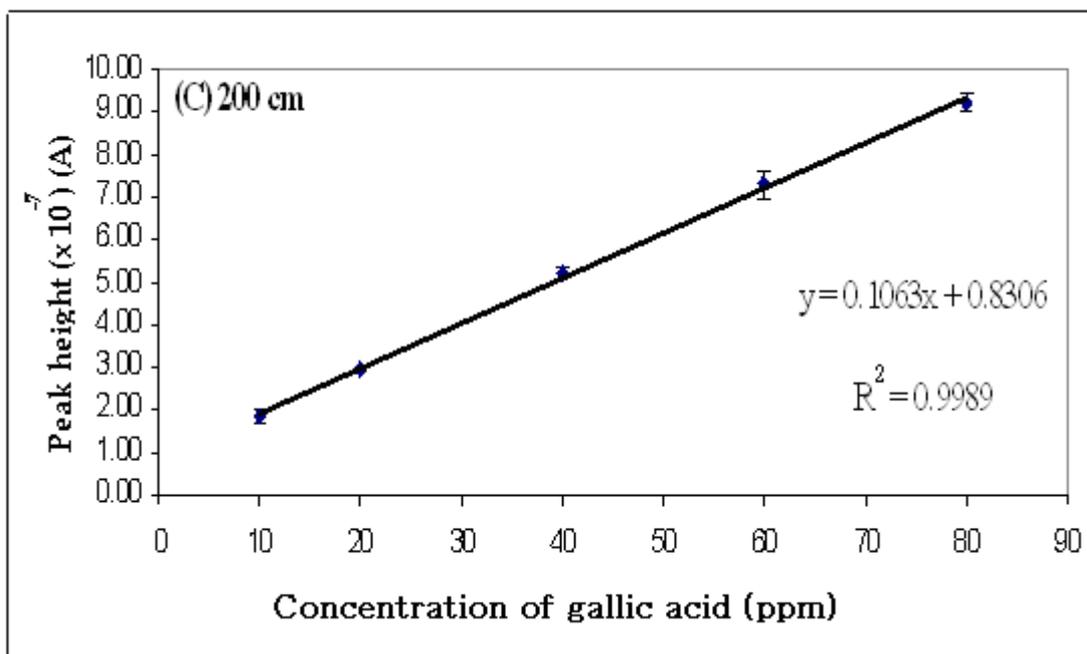
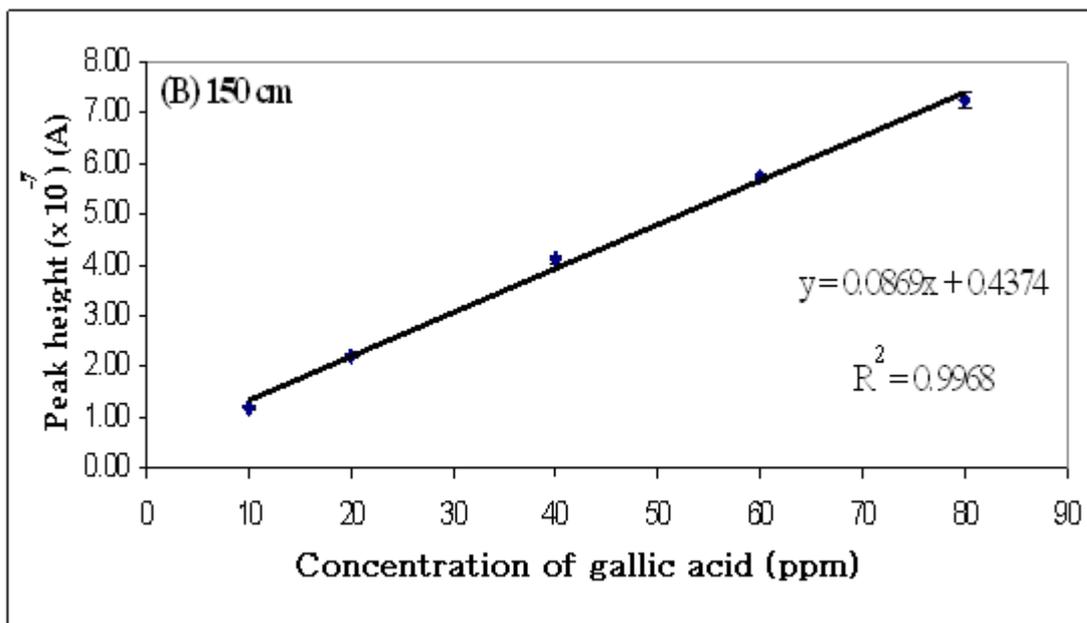
Reaction coil length (cm)	Concentration of gallic acid (ppm)	Peak height ( $\times 10^{-7}$ ) (A)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean	SD
100	10	1.54	1.53	1.22	1.43	0.18
	20	2.55	2.47	2.56	2.53	0.05
	40	4.49	4.72	4.65	4.62	0.12
	60	6.46	6.57	6.55	6.53	0.06
	80	8.16	8.38	8.36	8.30	0.12
150	10	1.23	1.12	1.14	1.16	0.06
	20	2.14	2.23	2.21	2.19	0.05
	40	4.04	4.12	4.15	4.10	0.06
	60	5.81	5.73	5.64	5.73	0.09
	80	7.13	7.22	7.42	7.26	0.15
200	10	1.82	1.64	2.04	1.83	0.20
	20	2.93	2.91	2.91	2.92	0.01
	40	5.29	5.05	5.30	5.21	0.15
	60	7.46	6.91	7.48	7.28	0.32
	80	9.31	8.97	9.42	9.23	0.23

ตารางที่ 44 (ต่อ) ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้ ความยาวของ reaction coil แตกต่างกัน

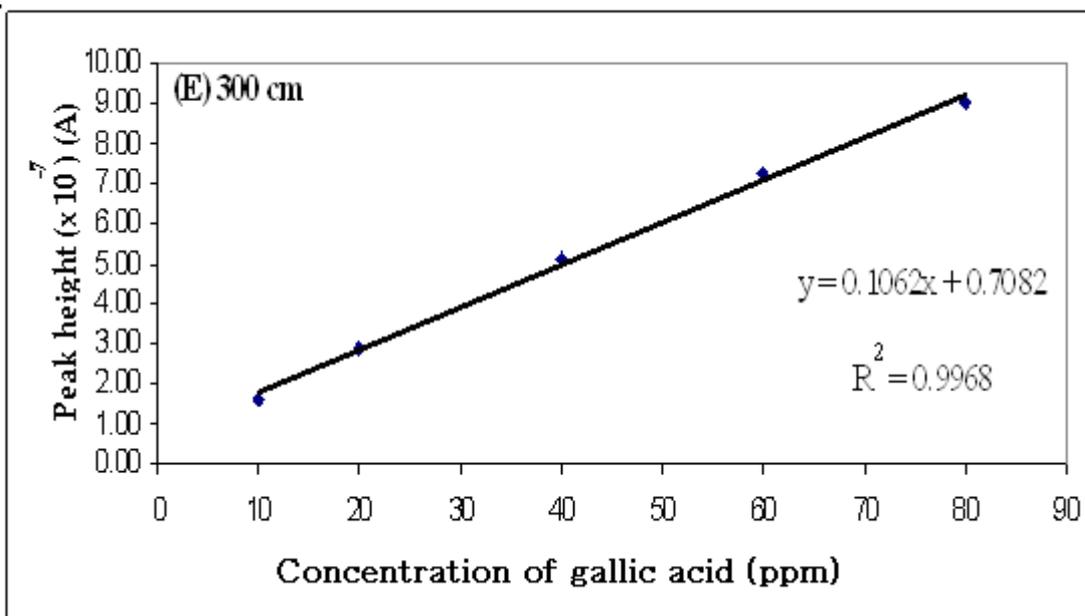
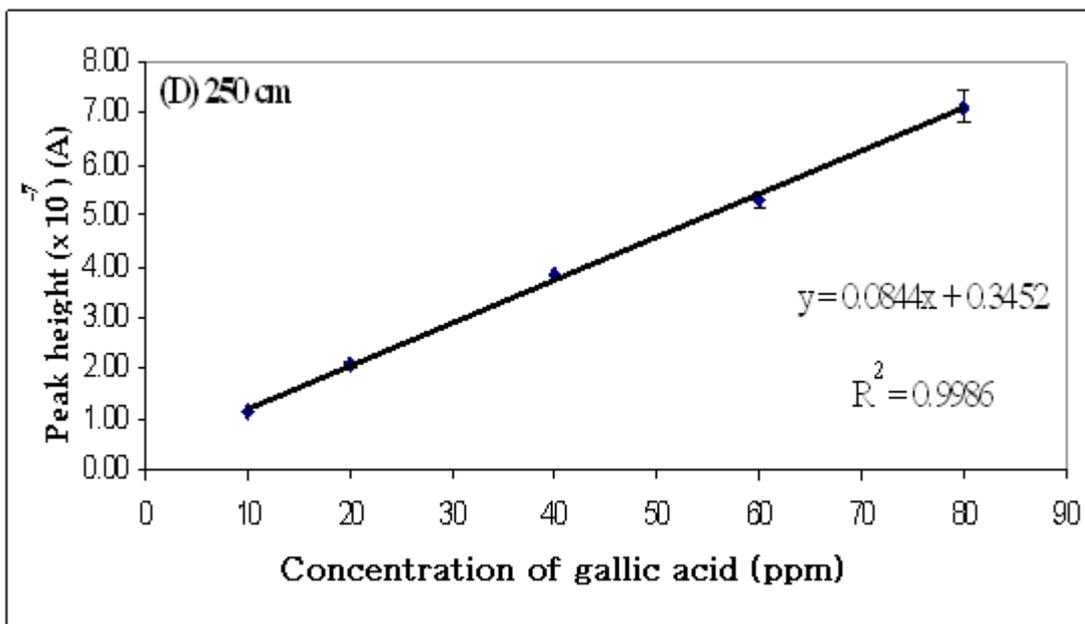
Reaction coil length (cm)	Concentration of gallic acid (ppm)	Peak height ( $\times 10^{-7}$ ) (A)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean	SD
250	10	1.14	1.13	1.13	1.13	0.01
	20	2.04	2.14	2.01	2.06	0.07
	40	3.84	3.84	3.82	3.83	0.01
	60	5.42	5.11	5.34	5.29	0.16
	80	6.75	7.32	7.32	7.13	0.33
300	10	1.65	1.62	1.56	1.61	0.05
	20	2.91	2.82	2.85	2.86	0.05
	40	5.14	5.02	5.15	5.10	0.07
	60	7.15	7.29	7.34	7.26	0.10
	80	9.01	9.02	8.99	9.01	0.02



รูปที่ 58 Calibration curve ของ gallic acid ใช้ความยาวของ reaction coil ต่างๆ คือ (A) 100, (B) 150, (C) 200, (D) 250, และ (E) 300 cm



รูปที่ 58 (ต่อ) Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ความยาวของ reaction coil ต่างๆ คือ (A) 100, (B) 150, (C) 200, (D) 250 cm, และ (E) 300 cm



รูปที่ 58 (ต่อ) Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ความยาวของ reaction coil ต่างๆ คือ (A) 100, (B) 150, (C) 200, (D) 250, และ (E) 300 cm

ตารางที่ 45 ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า  $R^2$  เมื่อใช้ความยาวของ reaction coil ต่างกัน

Reaction coil length (cm)	สมการเส้นตรง	$R^2$
100	$y = 0.0983x + 0.5537$	0.9985
150	$y = 0.0869x + 0.4374$	0.9968
200	$y = 0.1063x + 0.8306$	0.9989
250	$y = 0.0844x + 0.3452$	0.9986
300	$y = 0.1062x + 0.7082$	0.9968

จากตารางที่ 45 พบว่าที่ความยาวเท่ากับ 200 cm นั้นให้ค่า  $R^2$  มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.9989 และมีค่าความชันมากที่สุดคือ 0.1063 ดังนั้นจึงเลือกความยาว reaction coil 200 cm สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในระบบ FI-ECD

### 3.5.3.5 ผลของ Injection volume

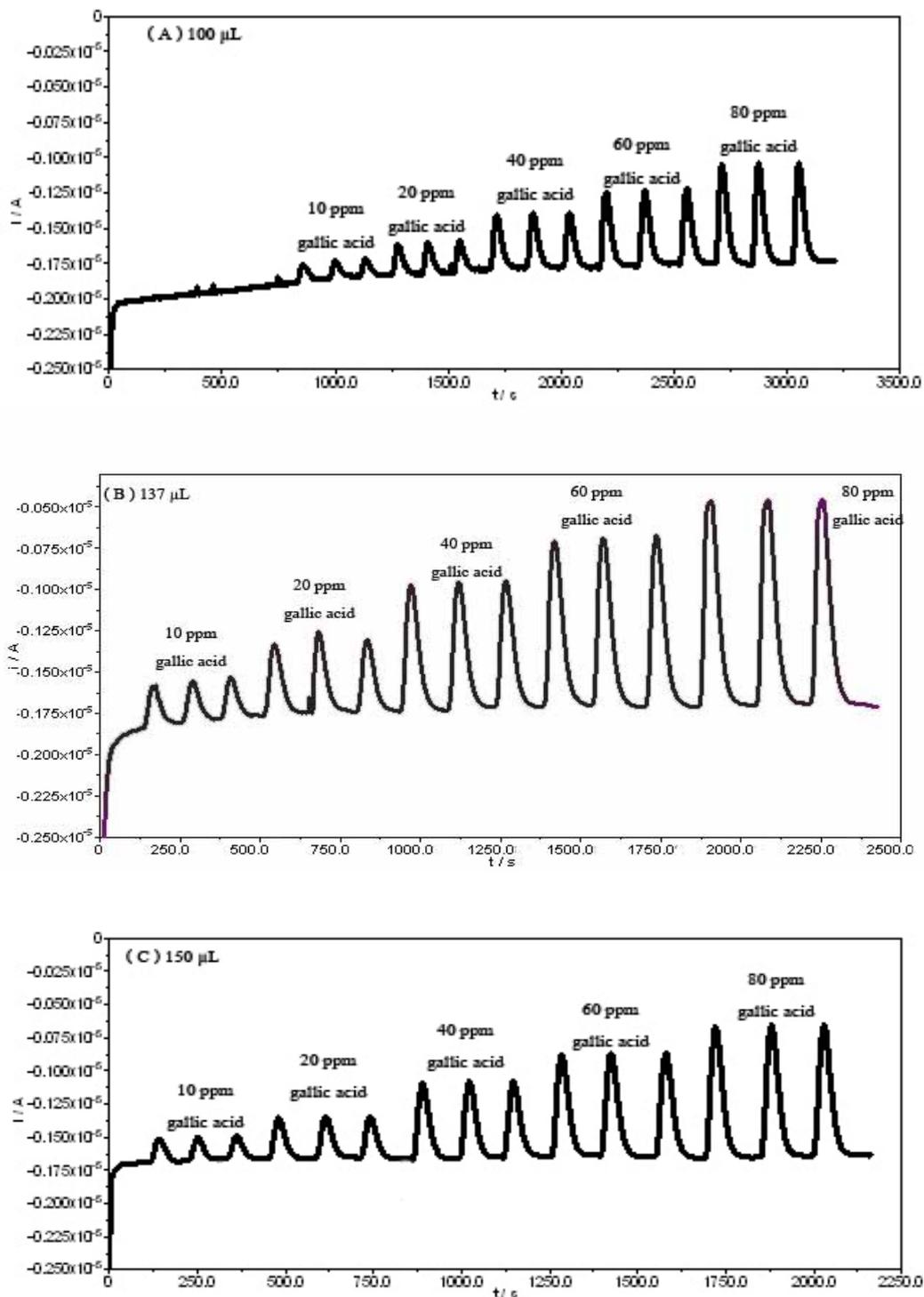
#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมเซลล์ตามข้อ 3.5.2 และจัดระบบ flow ตามผังในรูปที่ 49 ทำการบันทึกโดยใช้เทคนิค chronoamperometric และตั้งสภาวะการทดลองโดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min, ความยาว ของ reaction coil เท่ากับ 200 cm, injection volume 100  $\mu$ L, ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ detector cell -0.1 V vs Ag/AgCl, ABTS<sup>+</sup> radical 1.00 mM ซึ่งใช้เป็น reagent และ phosphate buffer pH 7.0 ทำหน้าที่เป็น carrier จากนั้นทำการ load และ inject สารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 10 - 80 ppm แสดงดังรูปที่ 59 (A)

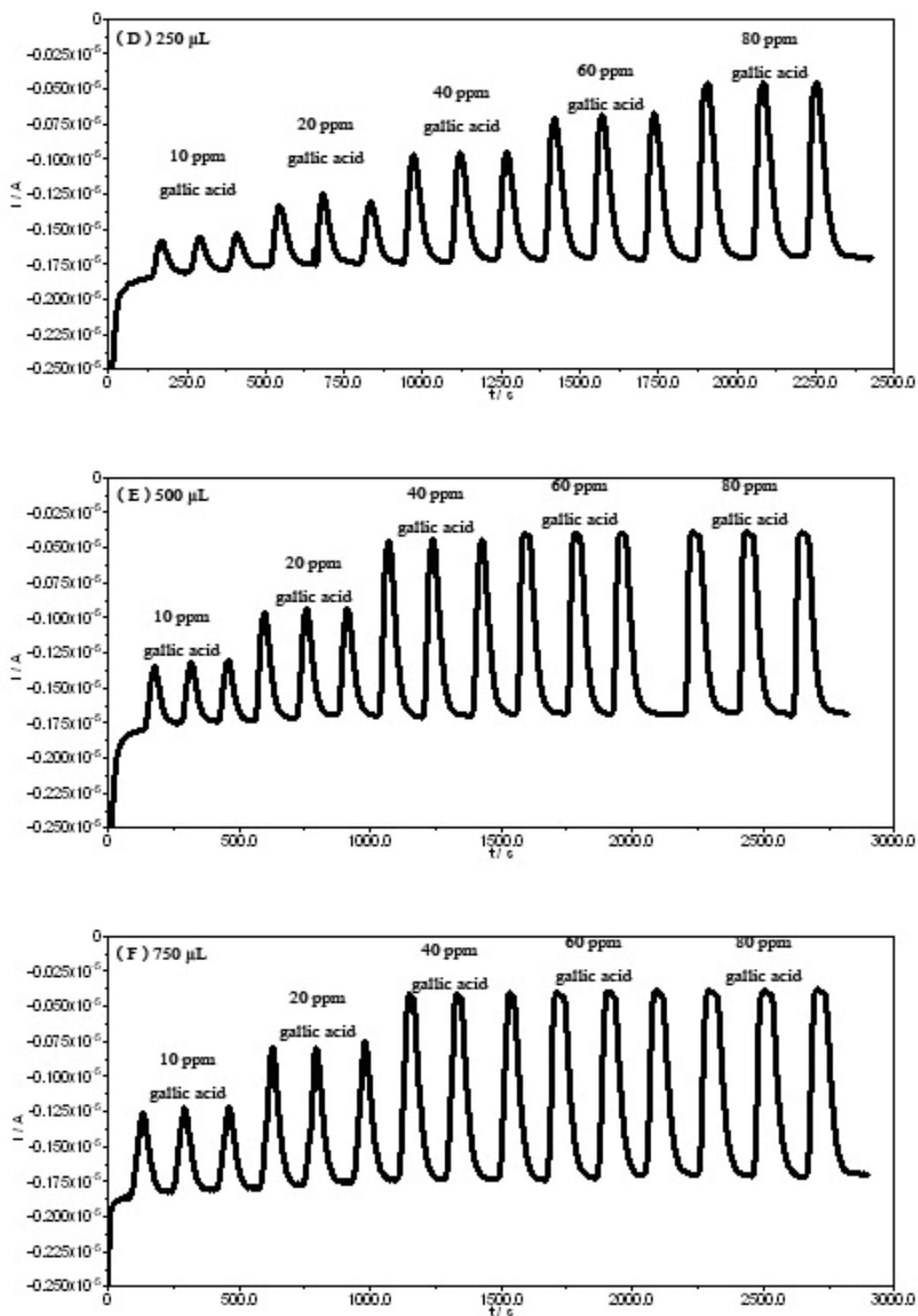
2. ทำการทดลองตามข้อ 1 แต่เปลี่ยน injection volume 137, 150, 250, 500 และ 750  $\mu$ L ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 59 (B-F)

3. วัดความสูงของพีคซึ่งเกิดจากการลดลงของ ABTS<sup>+</sup> radical หลังจากทำปฏิกิริยากับ สารมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 3.43 จากนั้นทำการพลอตค่าความสูงของพีคที่แต่ละความเข้มข้นของ gallic acid เมื่อใช้ injection volume ต่างกัน แสดงในกราฟมาตรฐานรูปที่ 60 (A-F) และลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า  $R^2$  ในรูป 60 สรุปผลในตารางที่ 47

## ผลการทดลอง



รูปที่ 59 สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ injection volume ต่างกันคือ (A) 100, (B) 137, (C) 150, (D) 250, (E) 500 และ (F) 750 µL



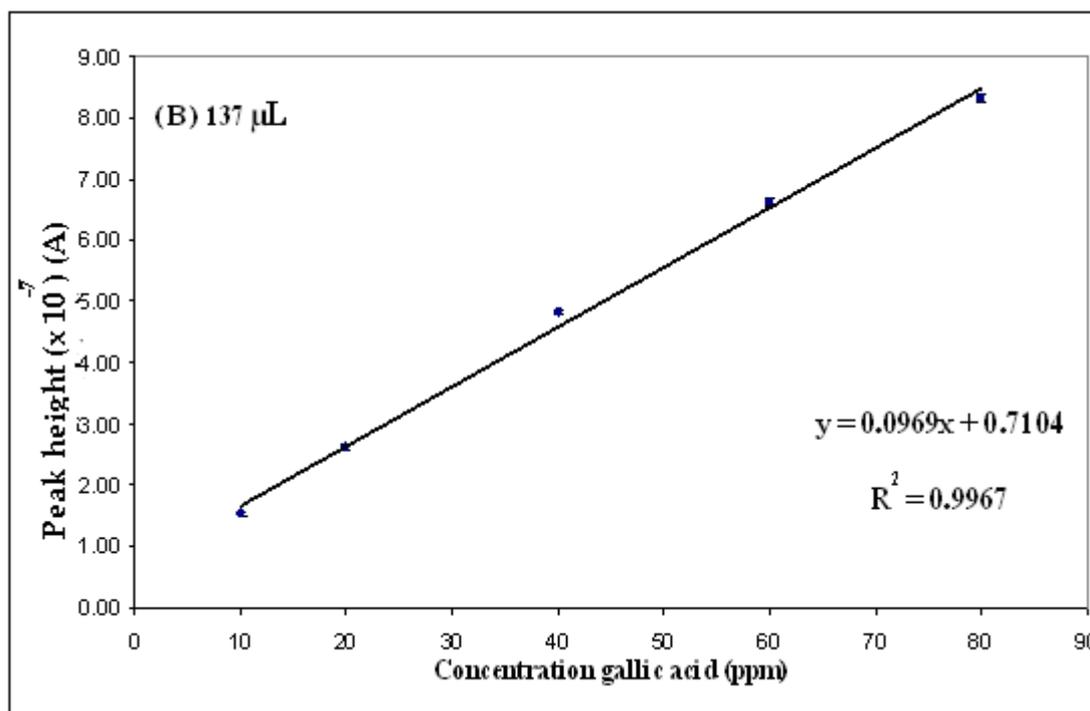
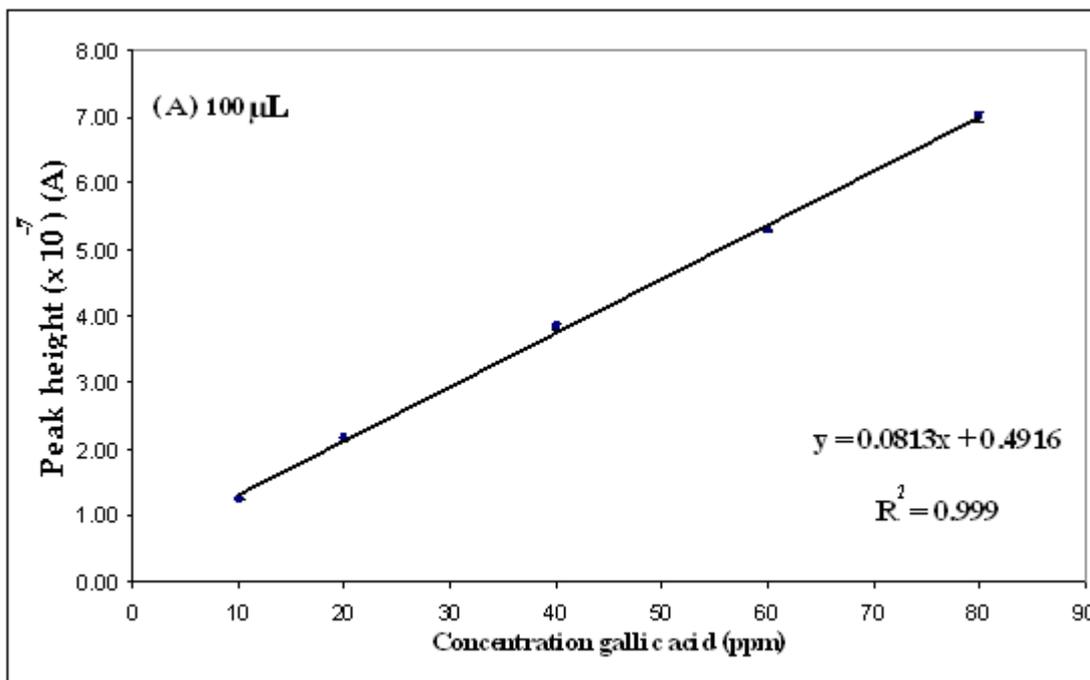
รูปที่ 59 (ต่อ) สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm เมื่อใช้ injection volume ต่างกันคือ (A) 100, (B) 137, (C) 150, (D) 250, (E) 500 และ (F) 750  $\mu$ L

ตารางที่ 46 ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้ injection volume ต่างกัน

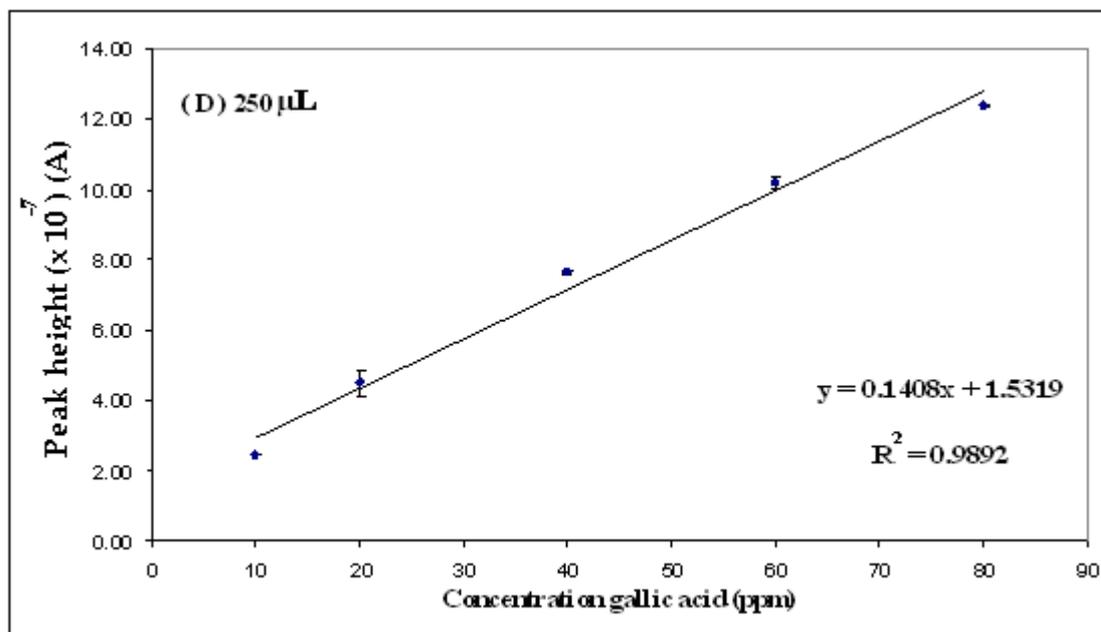
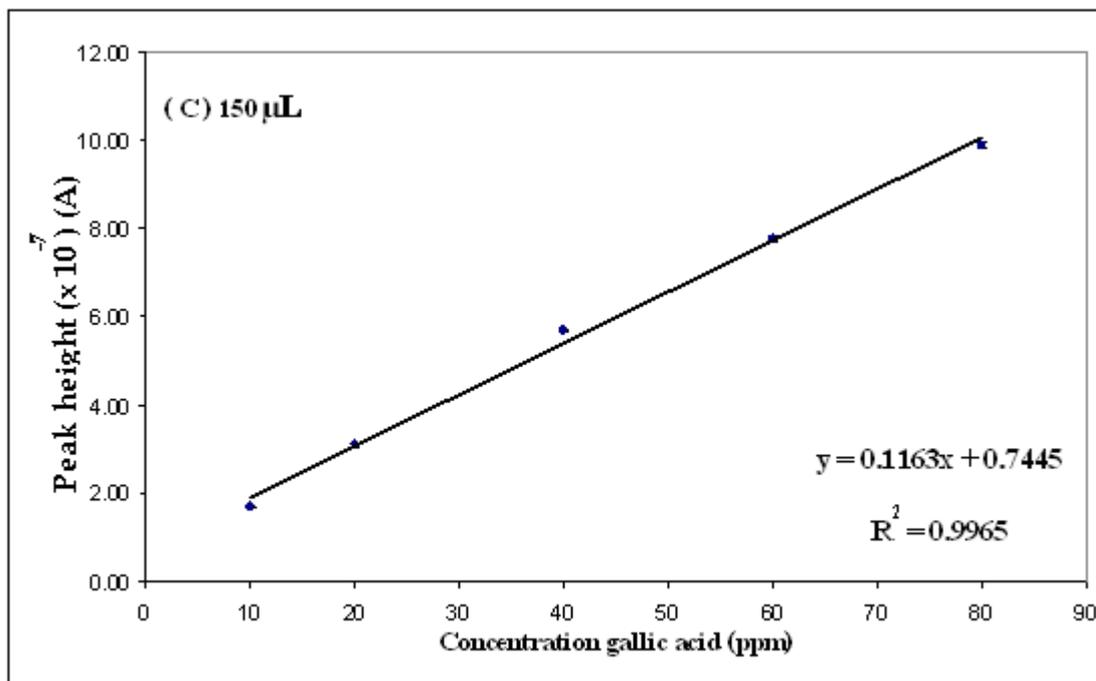
Injection volume ( $\mu\text{L}$ )	Concentration of gallic acid (ppm)	Peak height ( $\times 10^{-7}$ ) (A)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean	SD
100	10	1.22	1.27	1.24	1.24	0.03
	20	2.10	2.18	2.16	2.15	0.04
	40	3.80	3.88	3.86	3.85	0.04
	60	5.28	5.29	5.31	5.29	0.02
	80	6.99	7.09	6.93	7.00	0.08
137	10	1.52	1.57	1.55	1.55	0.03
	20	2.66	2.56	2.65	2.62	0.06
	40	4.79	4.80	4.84	4.81	0.03
	60	6.56	6.64	6.67	6.62	0.06
	80	8.28	8.25	8.38	8.30	0.07
150	10	1.73	1.70	1.69	1.71	0.02
	20	3.03	3.11	3.13	3.09	0.05
	40	5.71	5.69	5.68	5.69	0.02
	60	7.70	7.75	7.84	7.76	0.07
	80	9.92	9.93	9.80	9.88	0.07

ตารางที่ 46 (ต่อ) ค่าความสูงของพีคที่ความเข้มข้นของ gallic acid ต่างๆเมื่อใช้ injection volume ต่างกัน

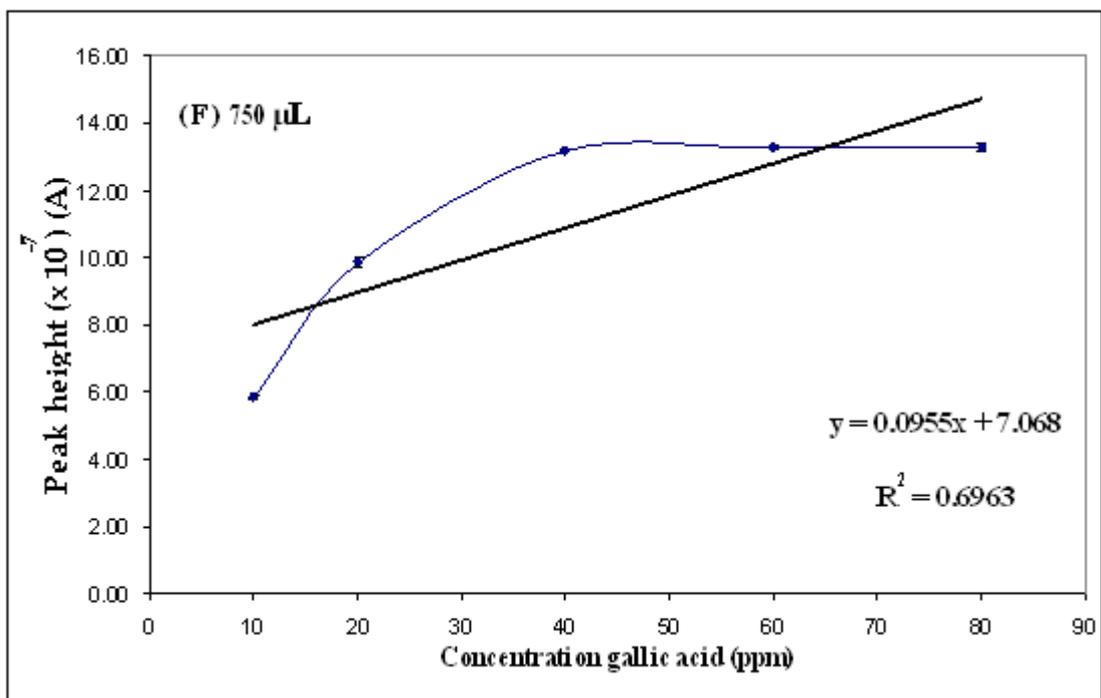
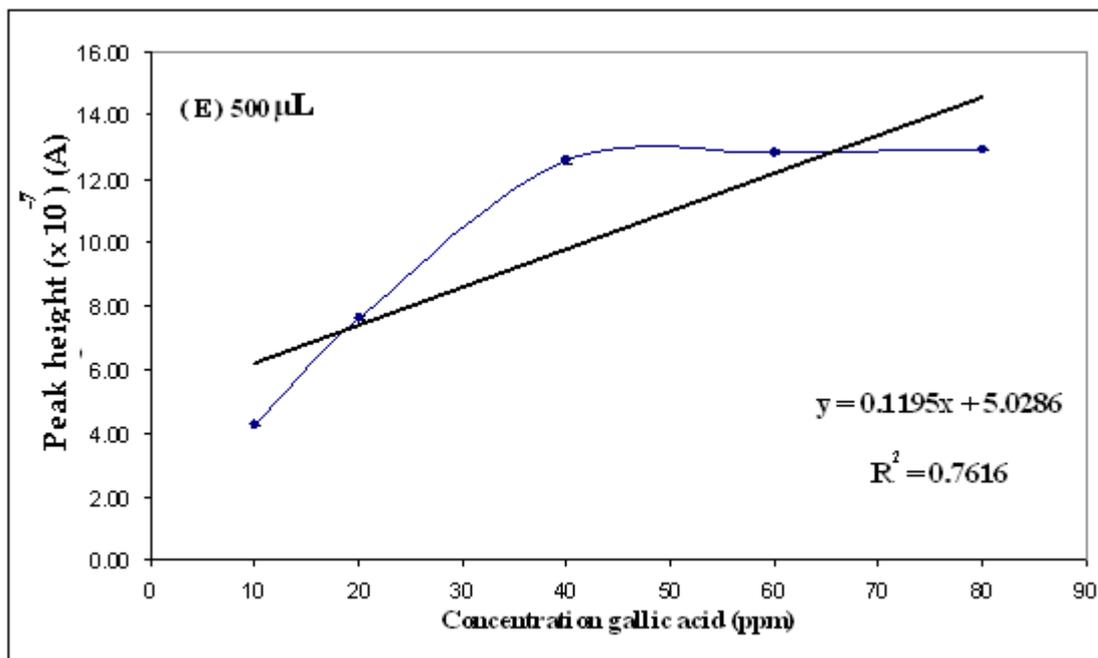
Injection volume ( $\mu\text{L}$ )	Concentration of gallic acid (ppm)	Peak height ( $\times 10^{-7}$ ) (A)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean	SD
250	10	2.47	2.45	2.42	2.45	0.02
	20	4.26	4.95	4.35	4.52	0.37
	40	7.65	7.71	7.62	7.66	0.05
	60	10.0	10.2	10.4	10.2	0.17
	80	12.5	12.4	12.4	12.4	0.04
500	10	4.33	4.25	4.27	4.28	0.04
	20	7.64	7.65	7.59	7.63	0.03
	40	12.5	12.7	12.6	12.6	0.11
	60	12.8	12.9	12.9	12.8	0.04
	80	13.0	12.9	12.9	12.9	0.05
750	10	5.74	5.89	5.90	5.84	0.09
	20	9.94	9.68	9.89	9.84	0.14
	40	13.2	13.2	13.2	13.2	0.03
	60	13.4	13.2	13.2	13.3	0.08
	80	13.2	13.3	13.4	13.3	0.11



รูปที่ 60 Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ injection volume ต่างกันคือ (A) 100, (B) 137, (C) 150, (D) 250, (E) 500 และ (F) 750  $\mu\text{L}$



รูปที่ 60 (ต่อ) Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ injection volume ต่างกันคือ (A) 100, (B) 137, (C) 150, (D) 250, (E) 500 และ (F) 750  $\mu\text{L}$



รูปที่ 60 (ต่อ) Calibration curve ของ gallic acid เมื่อใช้ injection volume ต่างกันคือ (A) 100, (B) 137, (C) 150, (D) 250, (E) 500 และ (F) 750 µL

ตารางที่ 47 ลักษณะของกราฟมาตรฐานและค่า  $R^2$  เมื่อใช้ injection volume ต่างกัน

Injection volume ( $\mu\text{L}$ )	สมการเส้นตรง	$R^2$
100	$y = 0.0813x + 0.4916$	0.9990
137	$y = 0.0969x + 0.7104$	0.9967
150	$y = 0.1163x + 0.7445$	0.9965
250	$y = 0.1408x + 1.5319$	0.9892
500	$y = 0.1195x + 5.0286$	0.7616
750	$y = 0.0955x + 7.068$	0.6963

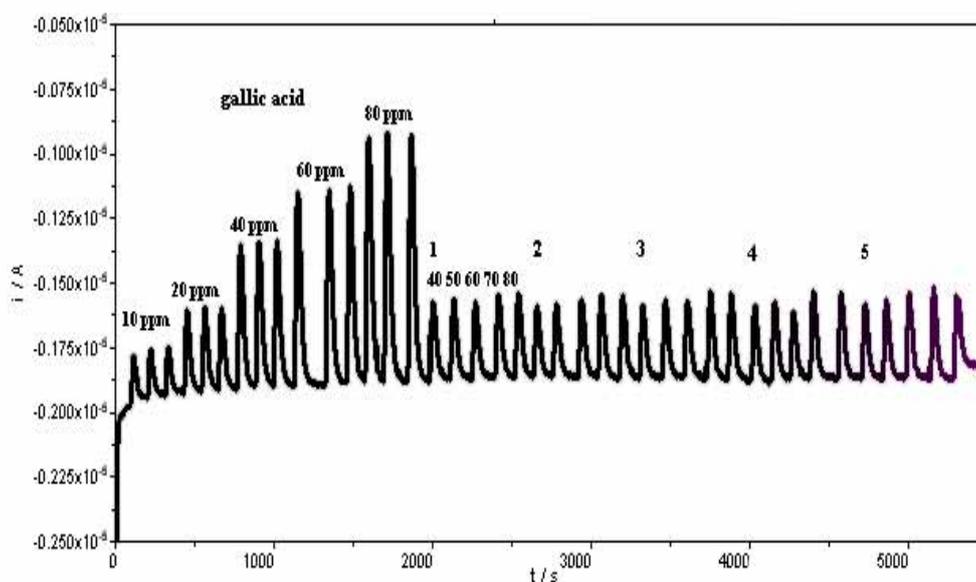
จากตารางที่ 47 ในช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid 10 – 80 ppm เมื่อใช้ Injection volume ต่างกันให้สมการเส้นตรงที่มี slope ต่างกันและค่า  $R^2$  ลดลงเมื่อ Injection volume เพิ่มขึ้น และเมื่อใช้ Injection volume เท่ากับ 100  $\mu\text{L}$  ให้ค่า  $R^2$  ใกล้ 1 มากที่สุดแต่เนื่องจากความยาวของ tube ที่ใช้ไม่สะดวกกับการยึดกับ injection port ดังนั้นจึงเลือก Injection volume เท่ากับ 137  $\mu\text{L}$  สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในระบบ FI-ECD ต่อไป

### 3.5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ antioxidant activity ของตัวอย่างสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ

#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมเซลล์ตามข้อ 3.5.2 และจัดระบบ flow ตามผังในรูปที่ 49 ทำการบันทึกโดยใช้เทคนิค chronoamperometric และตั้งสภาวะการทดลองโดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 mL/min, ความยาวของ reaction coil เท่ากับ 200 cm, injection volume 137  $\mu$ L, ศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ detector cell -0.1 V vs Ag/AgCl, ABTS<sup>+</sup> radical 1.00 mM เป็น reagent และ phosphate buffer pH 7.0 ทำหน้าที่เป็น carrier จากนั้นทำการ load และ inject สารมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 ppm และตามด้วยสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิด ที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 61

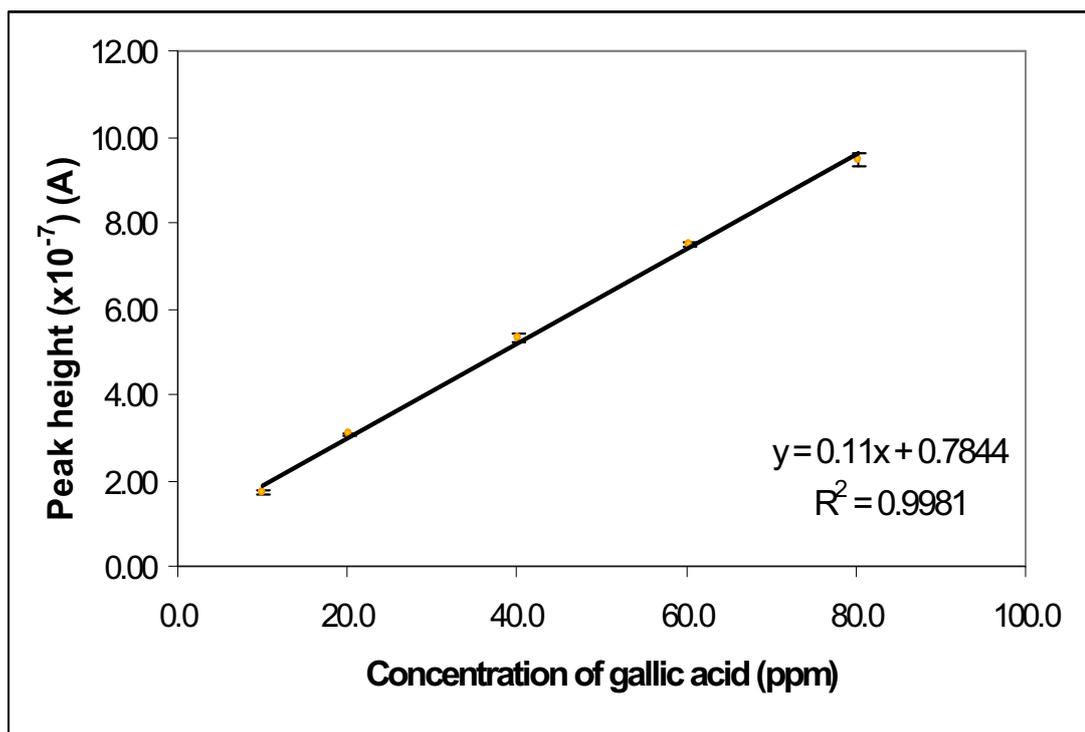
2. วัดความสูงของพีคซึ่งเกิดจากการลดลงของ ABTS<sup>+</sup> radical หลังจากทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐาน gallic acid แสดงในตารางที่ 48 และตารางที่ 49 แสดงความสูงของพีคเมื่อฉีดตัวอย่าง จากนั้นทำการพลอตค่าความสูงของพีคที่แต่ละความเข้มข้นของ gallic acid แสดงในกราฟมาตรฐานรูปที่ 62 และแสดงค่า antioxidant activity ของสารสกัดจากตัวอย่างชิงที่อุณหภูมิต่างๆ เป็น gallic acid equivalent ในตารางที่ 50



รูปที่ 61 สัญญาณการตอบสนองของ detector cell ต่อสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm และตัวอย่างสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40-80 °C (1-5)

ตารางที่ 48 ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคและความเข้มข้นของ gallic acid

Concentration of gallic acid (ppm)	Peak height (x 10 <sup>-7</sup> )				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	mean	SD
10	1.78	1.74	1.72	1.75	0.03
20	3.08	3.11	3.08	3.09	0.02
40	5.43	5.53	5.31	5.43	0.11
60	7.42	7.45	7.51	7.46	0.05
80	9.24	9.50	9.48	9.40	0.14



รูปที่ 62 Calibration curve ของ gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 10 – 80 ppm

ตารางที่ 49 ความสูงของพีคเมื่อนี้ดตัวอย่างของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ

Infusion temperature (°C)	Peak height (x 10 <sup>-7</sup> )				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5
40	3.01	2.64	2.69	2.85	2.83
50	3.05	2.74	2.99	3.09	3.06
60	2.90	2.92	2.98	2.52	3.20
70	3.16	3.09	3.41	3.31	3.50
80	3.25	3.20	3.28	3.28	3.09

ตารางที่ 50 ค่า antioxidant activity ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ

Infusion temperature (°C)	GAE (mg/g dried sample)					
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	Mean ± SD
40	2.02	1.69	1.73	1.88	1.86	1.83 ± 0.13
50	2.06	1.78	2.01	2.10	2.07	2.00 ± 0.13
60	1.92	1.94	2.00	1.58	2.20	1.93 ± 0.22
70	2.16	2.10	2.39	2.30	2.47	2.28 ± 0.15
80	2.24	2.19	2.27	2.26	2.09	2.21 ± 0.07

จากค่า antioxidant activity ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งแสดงในค่าของ GAE ในตารางที่ 50 เมื่อใช้การคำนวณทางสถิติคือ one way ANOVA เพื่อดูแนวโน้มของค่าที่วิเคราะห์ได้พบว่าค่า GAE ของสารสกัดเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40 °C น้อยกว่าค่า GAE ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C และที่อุณหภูมิ 70 และ 80 °C นั้นมีค่า GAE มากที่สุด

## บทที่ 4

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชั่นของขิงโดยใช้เทคนิควิธีวิเคราะห์แบบต่างๆ cyclic voltammetry เป็นวิธีที่ใช้บอกถึงคุณภาพและปริมาณของสารต้านออกซิเดชั่นที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ของ electroactive species ที่ผิวขั้วไฟฟ้า สำหรับ ABTS assay นั้นเป็นวิธีที่ใช้วัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ( radical scavenging method) และ Folin-Denis assay เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณ total phenolics ที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยทำการสกัดขิงด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) และสกัดเนื้อขิงด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 °C แบบระบบเปิดและระบบปิด และรายงานค่าในหน่วย mg gallic acid/ g dried sample สำหรับทุกเทคนิค นอกจากนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น โดยใช้เทคนิค FI-ECD ในการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดขิงที่สกัดด้วยน้ำ และทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นของตัวอย่างสารสกัดจากขิงโดยใช้ infusion temperature

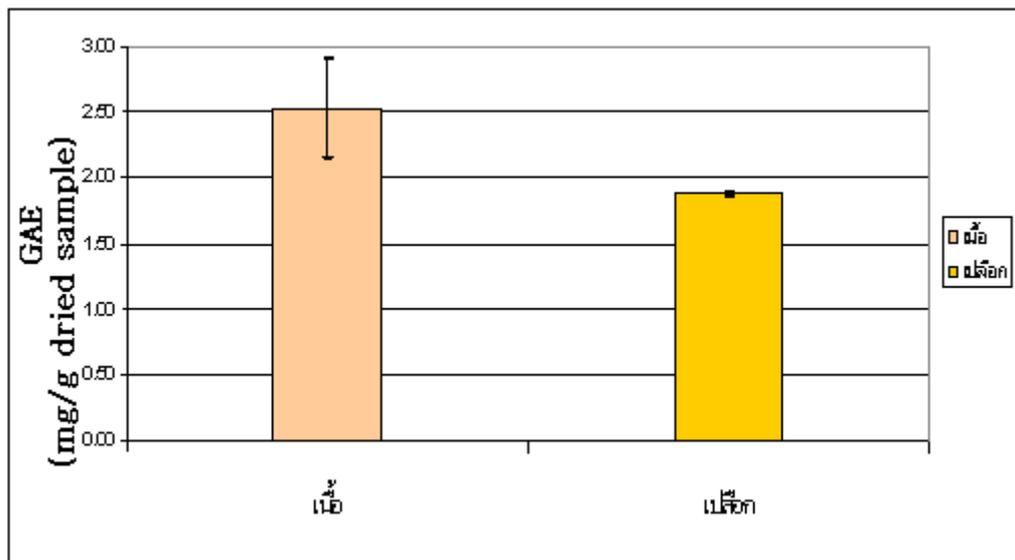
#### 4.1 การวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชั่นในสารสกัดจากขิง โดยเทคนิค cyclic voltammetry (CV)

จากการศึกษาการตอบสนองของสัญญาณไฟฟ้าของสารมาตรฐาน gallic acid บนขั้วไฟฟ้า GCE เมื่อใช้ scan rate 100 mV/s ใช้ supporting electrolyte เป็น phosphate buffer pH 7.0 พบว่าเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นแบบผันกลับไม่ได้ที่ตำแหน่งศักย์ไฟฟ้า ( $E_{pa}$ ) เท่ากับ 0.25 V vs. Ag/AgCl และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นในช่วง 0.2 – 1.0 mM และทำ calibration จากค่า anodic peak current ( $i_{pa}$ ) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid พบว่าให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังนั้นจึงสามารถใช้ประโยชน์เชิงปริมาณวิเคราะห์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 20

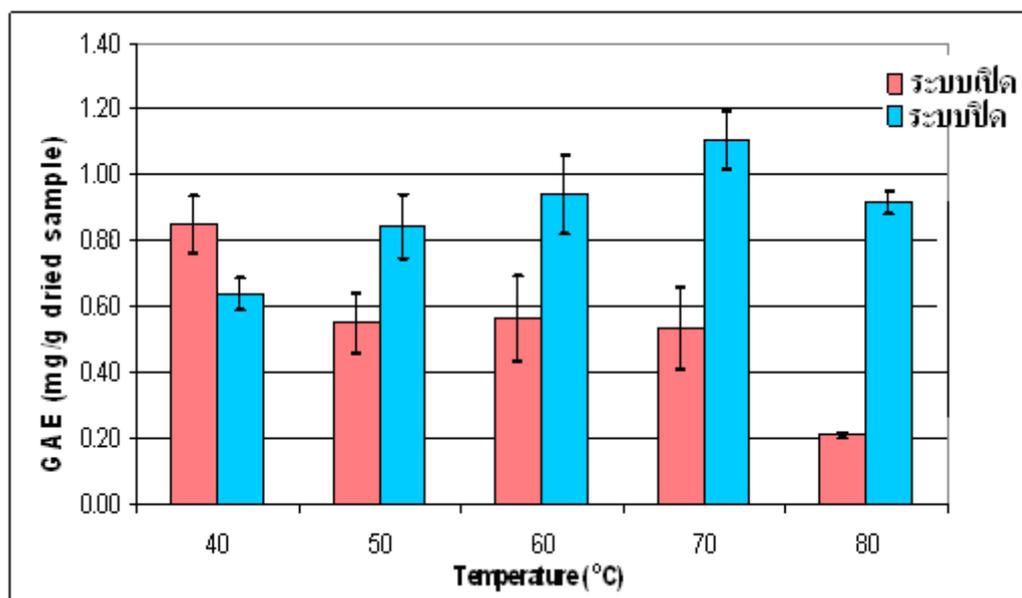
จากการทดลองค่า GAE ของสารสกัดขิงที่สกัดแบบต่างๆแสดงดังตาราง 51 กราฟเปรียบเทียบปริมาณสำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายของเปลือกขิงและเนื้อขิงแสดงในรูปที่ 63 และเมื่อนำเนื้อขิงมาสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 °C ทั้งแบบระบบปิดและแบบระบบเปิดเปรียบเทียบค่า GAE ที่แต่ละอุณหภูมิแสดงรูปที่ 64

ตารางที่ 51 ค่า GAE ของสารสกัดจากขิง วิเคราะห์โดยเทคนิค cyclic voltammetry

สารสกัดจากขิง	GAE (mg/g dried sample) $\pm$ SD	%RSD
acetone : methanol : H <sub>2</sub> O (7:7:6 v/v)		
เปลือกขิง	1.88 $\pm$ 0.01	0.53
เนื้อขิง	2.53 $\pm$ 0.38	15.1
สกัดเนื้อขิงด้วยน้ำระบบเปิด (°C)		
40	0.850 $\pm$ 0.088	10.3
50	0.549 $\pm$ 0.090	16.3
60	0.562 $\pm$ 0.128	22.8
70	0.533 $\pm$ 0.125	23.4
80	0.209 $\pm$ 0.007	3.46
สกัดเนื้อขิงด้วยน้ำระบบปิด (°C)		
40	0.637 $\pm$ 0.049	7.63
50	0.844 $\pm$ 0.098	11.6
60	0.941 $\pm$ 0.120	12.8
70	1.105 $\pm$ 0.087	7.86
80	0.916 $\pm$ 0.033	3.61



รูปที่ 63 กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อจิง และเปลือกจิงด้วยตัวทำละลาย acetone: methanol: H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) โดยเทคนิค cyclic voltammetry



รูปที่ 64 กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดและระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค cyclic voltammetry

ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) พบว่าสารสกัดจากเนื้อขิงมีค่า GAE มากกว่าเปลือกขิง ส่วนสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิด พบว่าเมื่อวิเคราะห์ค่า GAE โดยใช้วิธีทางสถิติคือ One-way ANOVA และ Least significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P = 0.05) พบว่าข้อมูลที่ได้แบ่งเป็น 3 กลุ่มเรียงลำดับค่า GAE จากน้อยไปมากคือค่า GAE ที่ 80 °C น้อยกว่าค่า GAE ที่ 50, 60 และ 70 °C และค่า GAE นั้นมีค่ามากที่สุดที่อุณหภูมิ 40 °C เนื่องจากในระบบเปิดน่าจะทำให้สารที่เป็น volatile oil ระเหยไปพร้อมกับน้ำโดยเฉพาะที่ 80 °C จึงมี antioxidant activity น้อย ส่วนของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด พบว่าเมื่อวิเคราะห์ค่า GAE พบว่าข้อมูลที่ได้แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือเรียงลำดับจากน้อยไปมากคือค่า GAE ที่ 40 °C น้อยกว่าค่า GAE ที่ 50, 60, 80 °C และค่า GAE ที่ 70 °C มีค่ามากที่สุด ที่อุณหภูมิ 40 °C มี antioxidant activity ต่ำกว่าอุณหภูมิอื่น น่าจะเป็นผลจากการสกัดมีประสิทธิภาพน้อยกว่าอุณหภูมิอื่นๆเพราะสารต้านออกซิเดชั่นละลายออกมาได้น้อย

#### 4.2 การวิเคราะห์ antioxidant activity โดย 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging assay : (ABTS assay)

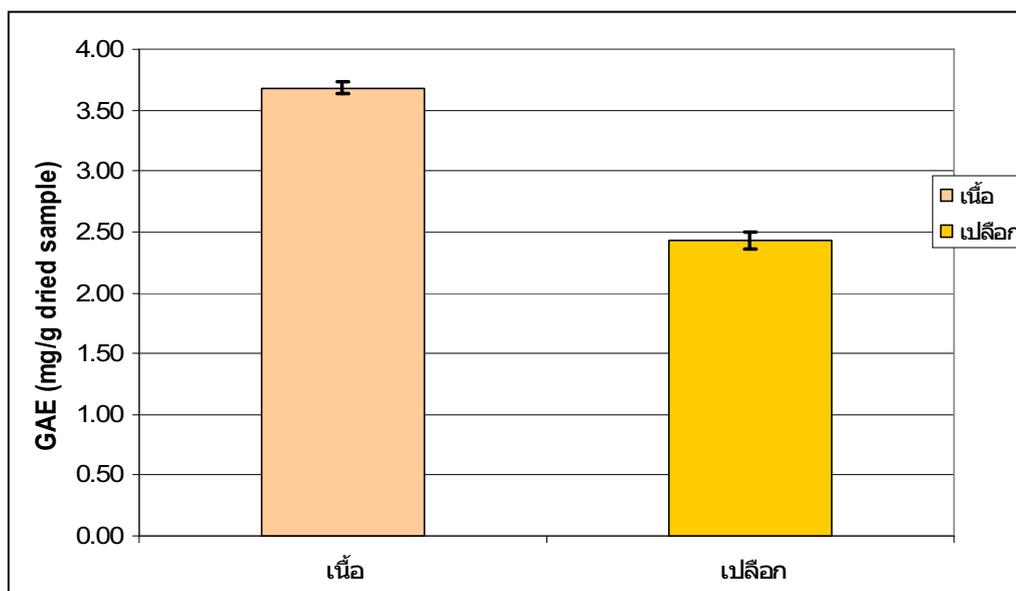
ผลการศึกษา spectrophotometric behavior ของ reagent 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็น stable radical ใน aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 730 nm เมื่อถูกรีดิวซ์จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดจากขิง จะทำให้ absorbance ที่ 730 nm ลดลง เมื่อศึกษา Kinetic curves โดยบันทึก absorbance ที่ความยาวคลื่น 730 nm เทียบกับเวลา ของ ABTS<sup>+</sup> reagent และ ABTS<sup>+</sup> reagent ผสมกับสารต้านออกซิเดชั่น พบว่าในช่วงเวลา 10 นาทีหลังจากผสม ABTS<sup>+</sup> reagent กับสารต้านออกซิเดชั่น ค่า absorbance มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่หลังจากเวลา 30 นาทีเป็นต้นไป ดังนั้นในการวิเคราะห์ antioxidant activity ในสารละลายมาตรฐาน และสารสกัดจากขิง จึงใช้เวลา incubation 30 นาที

การรายงาน antioxidant activity เป็นค่า EC<sub>50</sub> ซึ่งค่า EC<sub>50</sub> แสดงถึงปริมาณของสารต้านออกซิเดชั่นที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS<sup>+</sup> radical ลดลงเหลืออยู่ 50 % และในงานวิจัยนี้จะอาศัยการเปรียบเทียบค่า EC<sub>50</sub> ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เท่ากับ 0.643 ppm กับค่า EC<sub>50</sub> ของสารสกัดจากขิง โดยคำนวณออกมาเป็น gallic acid equivalent (GAE) ในหน่วย mg gallic acid/g dried sample ค่า EC<sub>50</sub> และค่า GAE ของสารสกัดจากขิงแสดงดังตารางที่ 52 และกราฟเปรียบเทียบค่า GAE ของสารสกัดจากขิงด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน

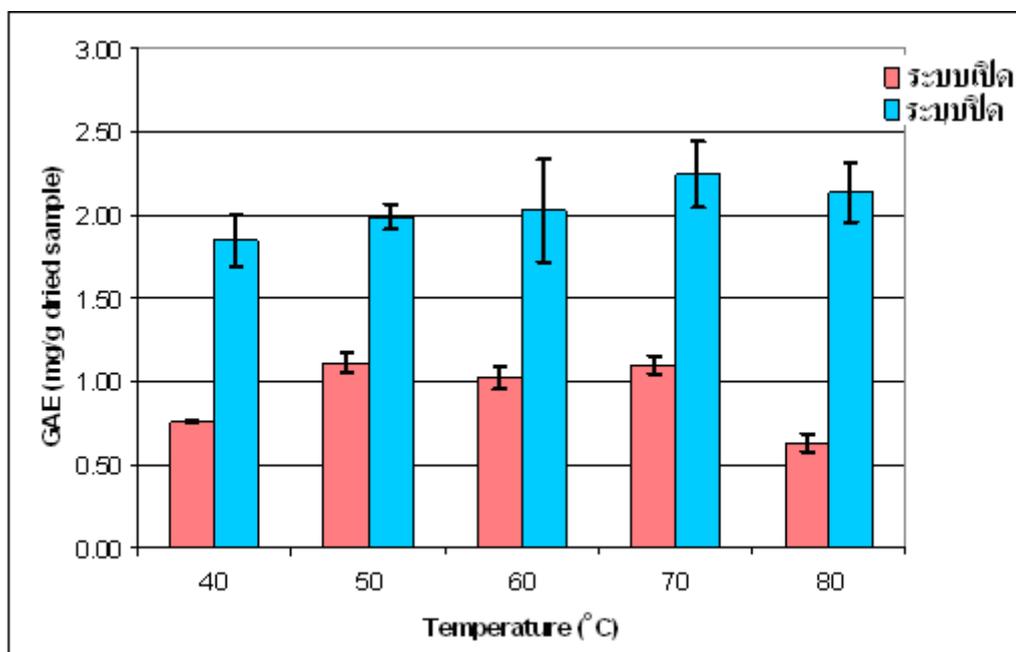
7:7:6 โดยปริมาตร) และสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆแบบระบบเปิด และระบบปิด แสดงในรูปที่ 65 และ 66 ตามลำดับ

ตารางที่ 52 ค่า  $EC_{50}$  และค่า GAE ของสารสกัดจากขิง วิเคราะห์โดยเทคนิค ABTS assay

สารสกัดจากขิง	$EC_{50}$	GAE (mg/g dried sample) $\pm$ SD	%RSD
acetone : methanol : H <sub>2</sub> O (7:7:6 v/v)			
เปลือกขิง	265 $\pm$ 8	2.43 $\pm$ 0.07	2.74
เนื้อขิง	175 $\pm$ 3	3.68 $\pm$ 0.05	1.36
สกัดเนื้อขิงด้วยน้ำระบบเปิด ( $^{\circ}$ C)			
40	276 $\pm$ 2	0.76 $\pm$ 0.00	0.76
50	187 $\pm$ 10	1.11 $\pm$ 0.06	5.40
60	205 $\pm$ 16	1.02 $\pm$ 0.07	6.86
70	191 $\pm$ 9	1.10 $\pm$ 0.05	4.68
80	333 $\pm$ 31	0.63 $\pm$ 0.06	8.40
สกัดเนื้อขิงด้วยน้ำระบบปิด ( $^{\circ}$ C)			
40	349 $\pm$ 28	1.85 $\pm$ 0.16	8.46
50	324 $\pm$ 12	1.99 $\pm$ 0.07	3.76
60	324 $\pm$ 57	2.03 $\pm$ 0.31	15.1
70	288 $\pm$ 28	2.25 $\pm$ 0.20	8.89
80	302 $\pm$ 24	2.14 $\pm$ 0.18	8.25



รูปที่ 65 กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อจิ้ง และเปลือกจิ้งด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) โดยเทคนิค ABTS assay



รูปที่ 66 กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อจิ้งด้วยน้ำแบบระบบเปิดและระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค ABTS assay

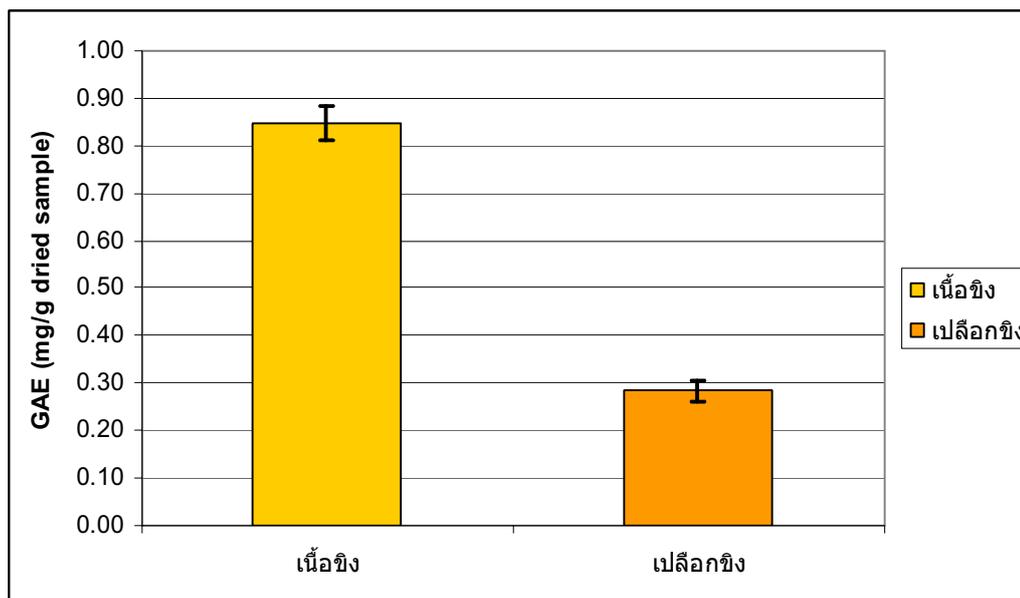
จากค่า antioxidant activity รายงานในหน่วย GAE ในสารสกัดจากเปลือกขิงและเนื้อขิง ด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) พบว่าสารสกัดจากเนื้อขิงมีค่า GAE มากกว่าเปลือกขิงประมาณ 1.5 เท่า ส่วนค่า antioxidant activity ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิด พบว่าเมื่อวิเคราะห์ผล โดยใช้วิธีทางสถิติ พบว่าค่า GAE ที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 °C มากกว่าค่า GAE ที่อุณหภูมิ 40 และ 80 °C ในขณะที่สารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดให้ GAE ที่อุณหภูมิทุกอุณหภูมิของการสกัดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P = 0.05) การสกัดแบบระบบปิดให้ค่า GAE มากกว่าการสกัดจากแบบระบบเปิด 1-3 เท่า

#### 4.3 การหาปริมาณ total phenolic compounds ในสารสกัดจากขิงด้วยเทคนิค Folin-Denis assay

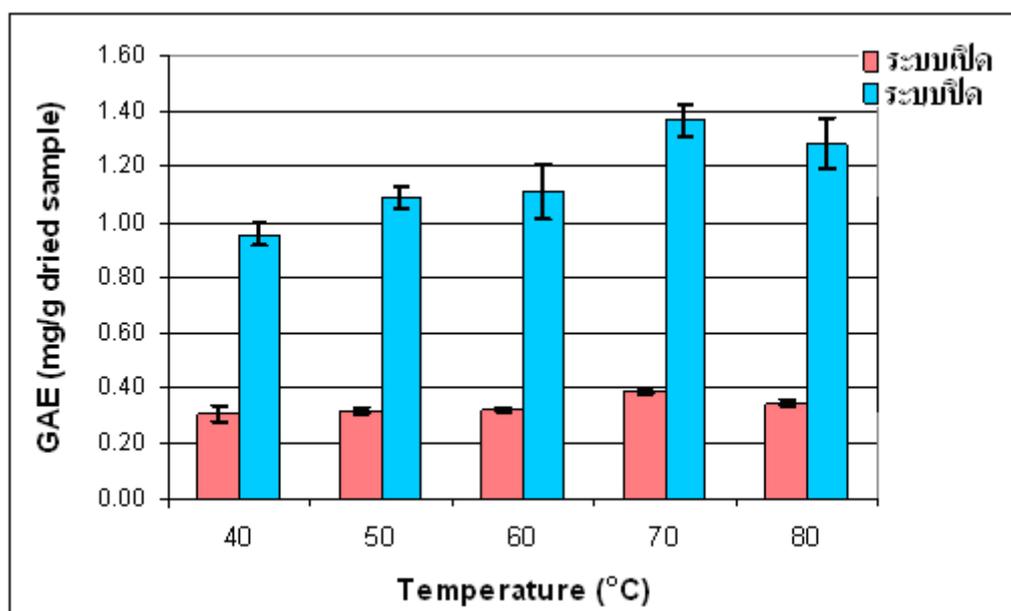
Folin-Denis assay ใช้ในการหาปริมาณ Total phenolics compounds โดยอาศัยปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันกับ Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 728 nm แล้วรายงานเป็นค่า GAE (mg/g dried sample) โดยใช้ gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน จากการทดลองแสดงปริมาณ Total phenolics compounds ของสารสกัดขิงที่สกัดแบบต่างๆ แสดงในตาราง 4.3 กราฟเปรียบเทียบปริมาณ total phenolic compounds สำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายของเปลือกขิงและเนื้อขิงแสดงในรูปที่ 4.5 และกราฟเปรียบเทียบปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัดเนื้อขิงด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 °C ทั้งแบบระบบปิดและแบบระบบเปิดสถานะแสดงดังรูปที่ 4.6

ตารางที่ 53 ค่าปริมาณ total phenolic compounds ทั้งหมดในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากขิง วิเคราะห์โดยเทคนิค Folin-Denis assay

สารสกัดจากขิง	GAE (mg/g dried sample) $\pm$ SD	%RSD
acetone : methanol : H <sub>2</sub> O (7:7:6 v/v)		
เปลือกขิง	0.28 $\pm$ 0.02	8.29
เนื้อขิง	0.85 $\pm$ 0.04	4.19
สกัดเนื้อขิงด้วยน้ำระบบเปิด (°C)		
40	0.28 $\pm$ 0.03	10.5
50	0.31 $\pm$ 0.01	4.82
60	0.32 $\pm$ 0.01	3.13
70	0.39 $\pm$ 0.01	2.99
80	0.35 $\pm$ 0.01	4.41
สกัดเนื้อขิงด้วยน้ำระบบปิด (°C)		
40	0.96 $\pm$ 0.04	4.29
50	1.09 $\pm$ 0.04	3.70
60	1.11 $\pm$ 0.10	9.07
70	1.37 $\pm$ 0.06	4.18
80	1.28 $\pm$ 0.09	7.24



รูปที่ 67 กราฟแสดงปริมาณ total phenolics compound ในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อชิง และเปลือกชิงด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) โดยเทคนิค Folin-Denis assay



รูปที่ 68 กราฟแสดงปริมาณ total phenolics compound ในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดและระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค Folin-Denis assay

ปริมาณ total phenolics compound ในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ในสารสกัดจากเปลือกขิงและเนื้อขิงด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) พบว่าสารสกัดจากเนื้อขิงมีค่ามีปริมาณ total phenolics compound มากกว่าเปลือกขิงประมาณ 3 เท่า ส่วนสารสกัดจากขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิด ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P = 0.05) พบว่ามีปริมาณ total phenolics compound ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 80°C มากกว่าที่อุณหภูมิ 70 °C และปริมาณ total phenolics compound ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด พบว่าข้อมูลที่ได้คือปริมาณ total phenolics compound ที่อุณหภูมิ 40°C มีค่าน้อยที่สุด และปริมาณ total phenolics compound ที่อุณหภูมิ 80 และ 70 °C มีค่ามากที่สุด คาดว่าเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงอาจทำให้ total phenolic compounds ละลายน้ำออกมาได้มากขึ้น

#### 4.4 การวิเคราะห์ antioxidant activity โดยเทคนิค Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD)

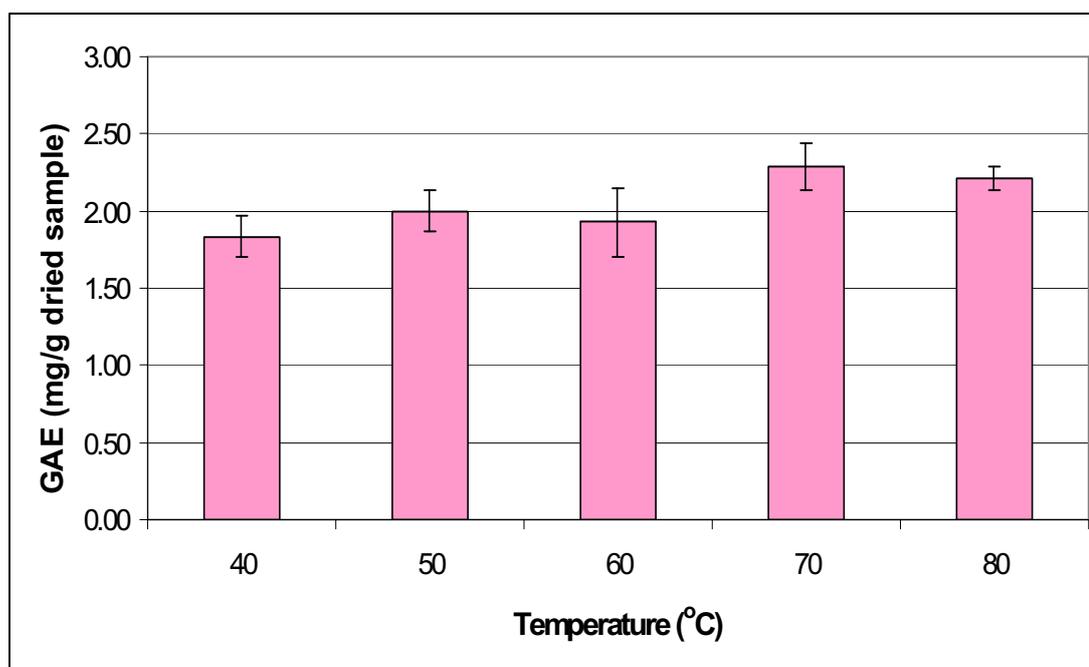
จากการศึกษา electrochemical behavior ของ ABTS<sup>+</sup> radical และพิจารณาความเสถียรของ ABTS<sup>+</sup> radical โดยพิจารณาจากรูปที่ 24 กำหนดค่า % Absorbance ที่ลดลงได้เท่ากับ 5% ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ดังนั้นจึงน่าจะสาเหตุที่ทำให้สัญญาณ baseline ที่ได้จากการทดลองสำหรับเทคนิค FI-ECD ที่มีค่าเปลี่ยนไปเนื่องจากปริมาณของ ABTS<sup>+</sup> radical ลดลง การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ เพื่อหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ antioxidant activity โดยเทคนิค Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD) ได้ผลสรุปในตารางที่ 54 และค่า antioxidant activity ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 °C รายงานในหน่วย GAE (mg/g dried sample) แสดงในตารางที่ 55 และกราฟเปรียบเทียบค่า antioxidant activity แสดงในรูปที่ 69

ตารางที่ 54 สภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค Flow Injection-Electrochemical Detection (FI-ECD)

Characteristics	Optimum Value
Potential applied (E <sub>app</sub> ) (V)	-0.1
Concentration of ABTS <sup>+</sup> radical (mM)	1.00
Flow rate (mL/min)	1.54
Reaction coil length (cm)	200
Injection volume (μL)	137

ตารางที่ 55 ค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด วิเคราะห์โดยเทคนิค FI-ECD

Infusion temperature (°C)	GAE ( mg/g dried sample)	%RSD
40	1.83 ± 0.13	7.18
50	2.00 ± 0.13	6.53
60	1.93 ± 0.22	11.6
70	2.28 ± 0.15	6.69
80	2.21 ± 0.07	3.31



รูปที่ 69 กราฟแสดงค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค FI-ECD

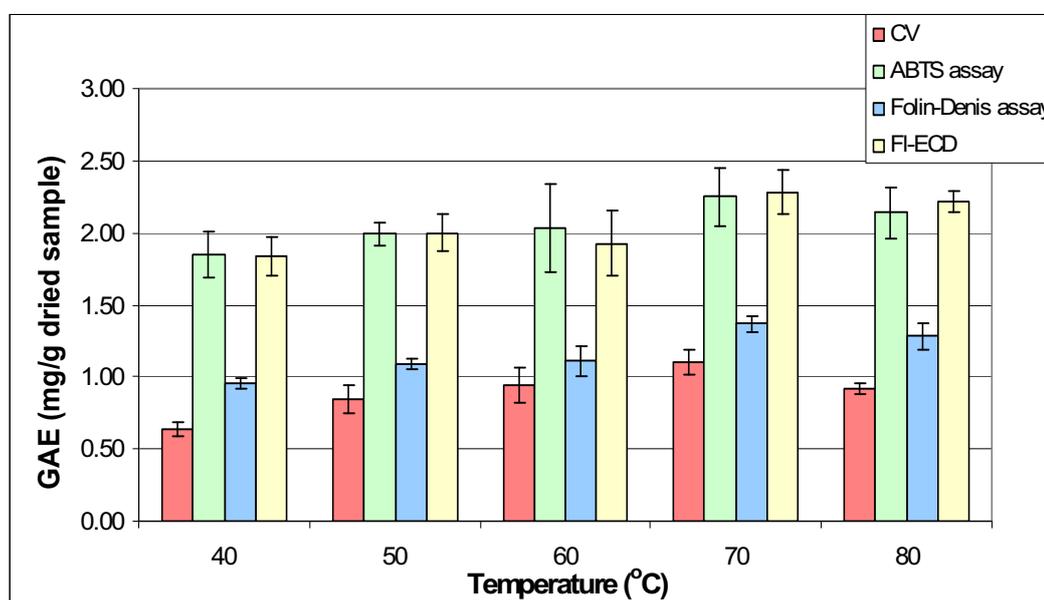
ค่า antioxidant activity รายงานในหน่วย GAE (mg/g dried sample) ในสารสกัดจากสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด เมื่อวิเคราะห์ค่า GAE พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงที่อุณหภูมิ 40 °C น้อยกว่าค่า GAE ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C โดยที่อุณหภูมิที่ 70, 80 °C นั้นมีค่า GAE สูงที่สุดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P = 0.05) จากการวิเคราะห์แสดงว่าที่อุณหภูมิสูงนั้นมี

antioxidant activity สูงอาจเป็นเพราะสารต้านออกซิเดชันนั้นละลายออกมาได้เพิ่มมากขึ้น ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย สะดวกรวดเร็ว และมี sample throughput 27 ตัวอย่างต่อ 1 ชั่วโมง ผลการสกัดเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบปิดให้ค่า GAE มากกว่าการสกัดแบบระบบเปิดตั้งแต่ 1-4 เท่า

#### 4.5 การเปรียบเทียบผลการทดลองจากวิธีวิเคราะห์ต่างๆ

ผลของค่า GAE จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆของสารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบเปิดที่อุณหภูมิ 80 °C มีค่าน้อยนั้น คาดว่าเพราะการสกัดแบบระบบเปิดทำให้ volatile oil และสารที่สกัดได้จากขิงนั้นระเหยออกไป แต่สำหรับการสกัดเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิ 80 °C นั้นพบว่าค่า GAE มีค่าสูงนั้นอาจเนื่องจากการปิดฝาทำให้ป้องกันการระเหยของสารสกัดที่ได้ ดังนั้นจึงพบว่าค่า GAE ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเนื้อจึงที่สกัดด้วยน้ำแบบระบบปิดมีค่ามากกว่าที่สกัดด้วยน้ำแบบระบบเปิดตั้งแต่ 1-4 เท่า

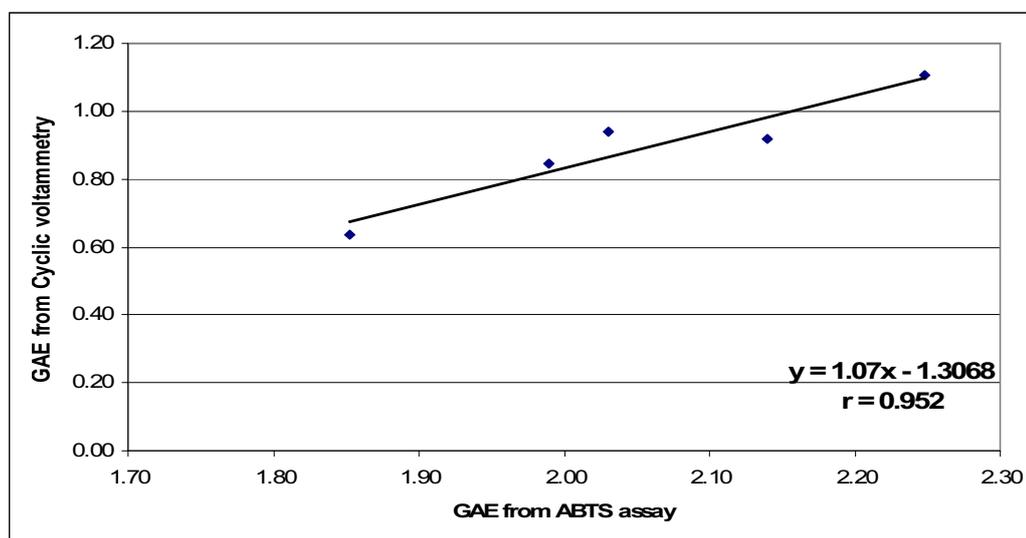
การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ของสารสกัดจากเนื้อจึงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค cyclic voltammetry, ABTS assay, Folin-Denis assay และ FI-ECD แสดงดังรูปที่ 70



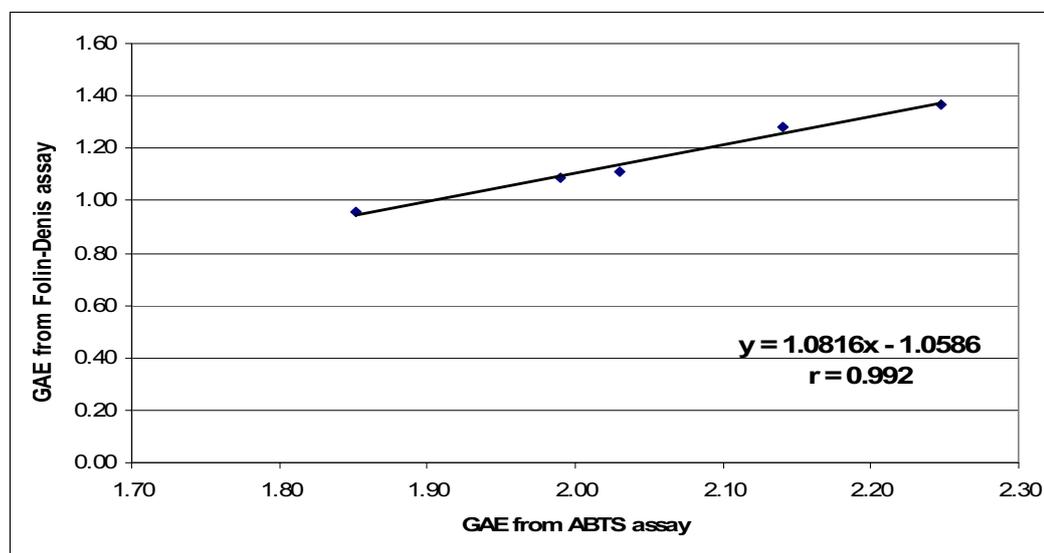
รูปที่ 70 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (°C) กับ ค่า GAE (mg/ g dried sample) จากเทคนิคต่างๆ

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์หาทั้งคุณภาพและปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำขิงที่ชงด้วยอุณหภูมิต่างๆ โดยการเปรียบเทียบแต่ละวิธีวิเคราะห์

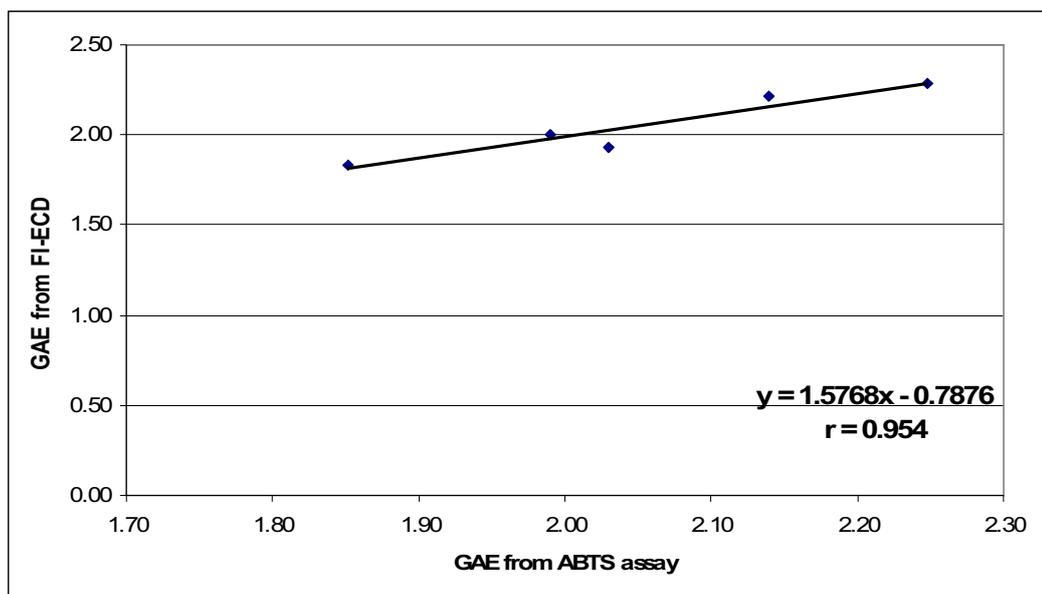
ด้วย regression analysis ความสัมพันธ์ของแต่ละวิธีแสดงดังรูปที่ 71-76 และรายงานค่า correlation coefficient (r) ดังตารางที่ 56



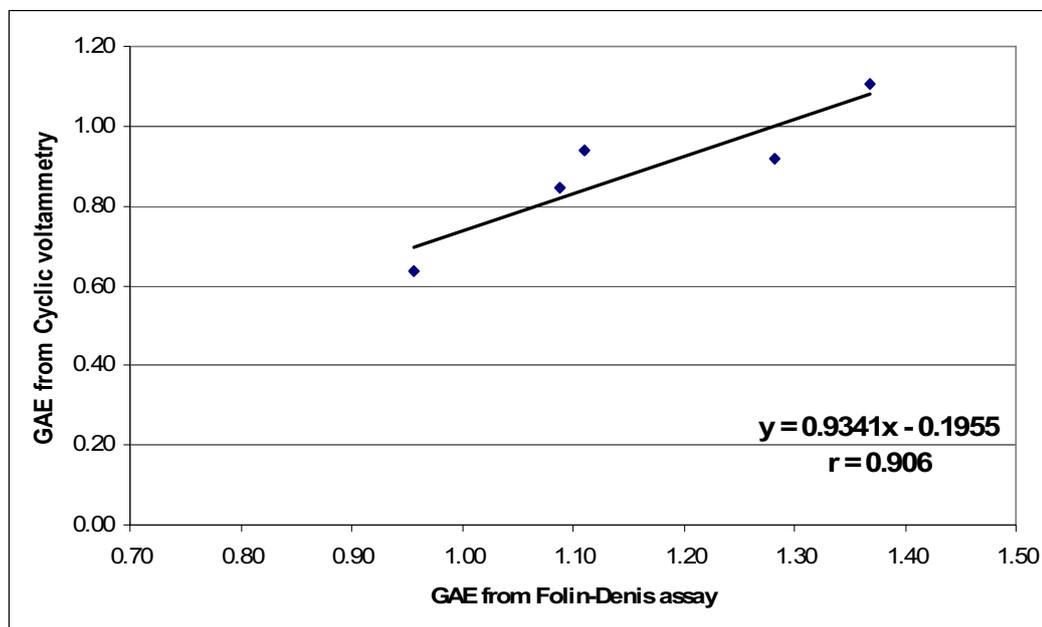
รูปที่ 71 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค ABTS assay และ cyclic voltammetry ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ



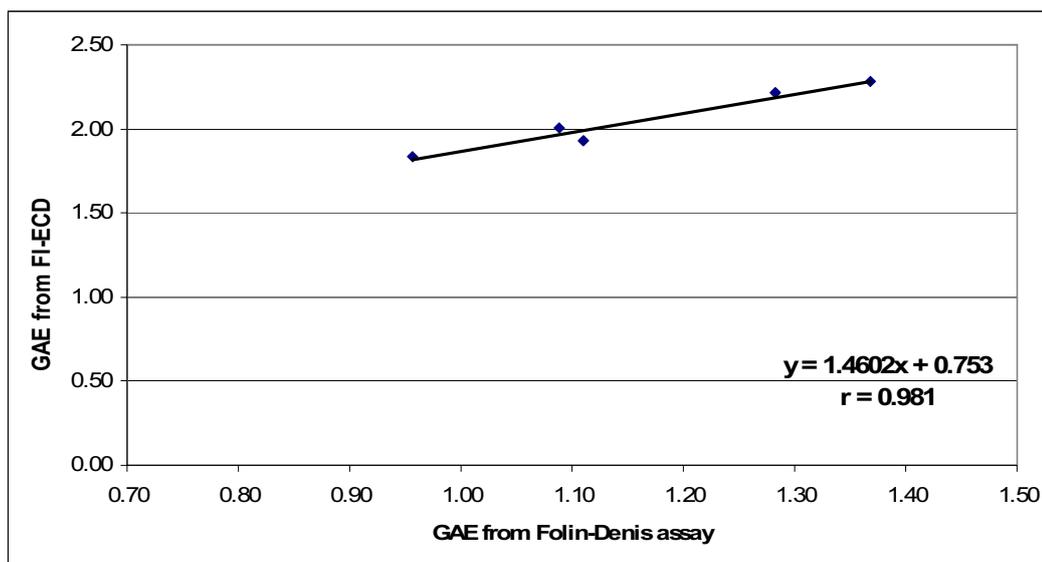
รูปที่ 72 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค ABTS assay และ Folin-Denis assay ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ



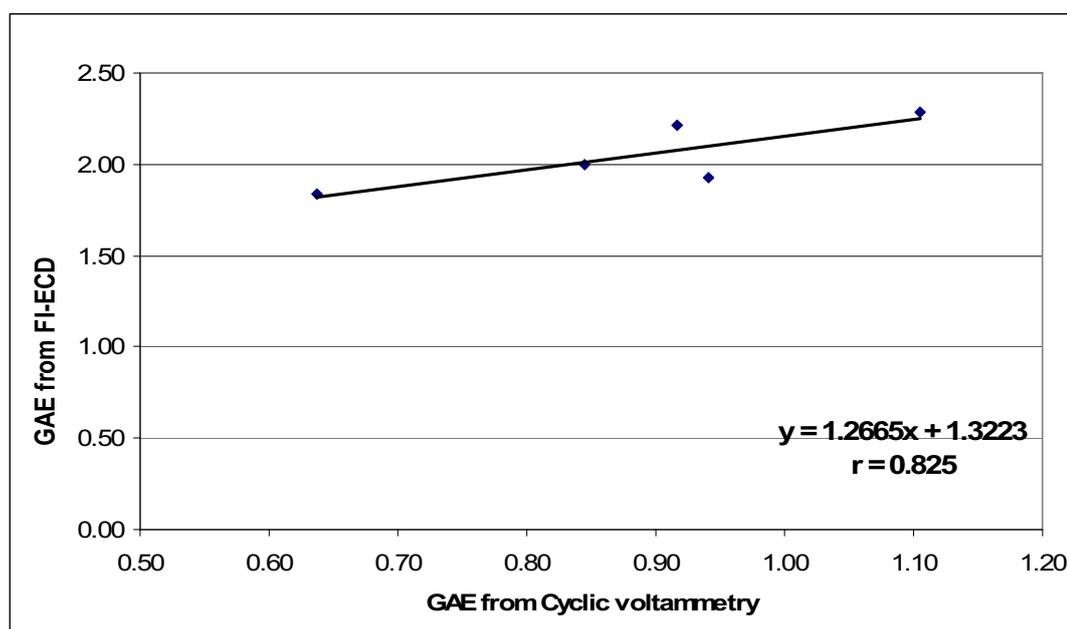
รูปที่ 73 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค ABTS assay และ FI-ECD ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 74 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค Folin-Denis assay และ cyclic voltammetry ของสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 75 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค Folin-Denis assay และ FI-ECD ของสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 76 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE (mg/g dried sample) จากเทคนิค cyclic voltammetry และ FI-ECD ของสารสกัดจากเนื้อจิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ

ตารางที่ 56 ค่า Correlation coefficient (r) ที่ได้จากการเปรียบเทียบแต่ละเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำแบบระบบปิดที่อุณหภูมิต่างๆ

เทคนิค	Correlation coefficient (r)			
	ABTS assay	CV	Folin-Denis	FI-ECD
ABTS assay	1	0.952	0.992	0.954
CV	0.952	1	0.906	0.825
Folin-Denis	0.992	0.906	1	0.981
FI-ECD	0.954	0.825	0.981	1

จากตารางที่ 56 พบว่าเมื่อนำสารสกัดจากเนื้อชิงด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ แบบระบบปิดมาวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ เมื่อนำมาเปรียบเทียบในแต่ละวิธี และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Pearson correlation พบว่าแต่ละวิธีนั้นมีความสอดคล้องกัน มีเพียงวิธี cyclic voltammetry และ FI-ECD ซึ่งมีค่า Correlation เท่ากับ 0.825 ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) เท่ากับ 0.086 มากกว่า .05 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นั่นคือ ผลการทดลองจากทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์กันน้อย น่าจะเนื่องมาจาก cyclic voltammetry และ FI-ECD นั้นมีหลักการแตกต่างกันคือ วิธี cyclic voltammetry นั้นตรวจวัดความสามารถในการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากชิง แต่วิธี FI-ECD นั้นเป็นการตรวจวัดความสามารถในการกำจัด  $ABTS^{\bullet+}$  radical และอาศัยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณไฟฟ้าของ  $ABTS^{\bullet+}$  radical หลังทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชัน

เทคนิค cyclic voltammetry สามารถใช้วิเคราะห์ได้ทั้งคุณภาพและปริมาณของสารสกัดจากชิง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ก็เป็นในทางเดียวกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ น่าเชื่อถือ สะดวก แต่ข้อเสียของ CV คือต้องทำ pretreatment ขั้วใช้งานหลังการวิเคราะห์สารตัวอย่างทุกครั้งเนื่องจากการดูดซับของ product หรือ reactant ที่ผิวขั้วใช้งาน และสำหรับเทคนิค FI-ECD แม้จะมีความสัมพันธ์กันน้อยกว่ากับเทคนิค cyclic voltammetry แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับ ABTS assay และ Folin-Denis assay ก็พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับวิธีทั้งสองดังนั้นเทคนิค FI-ECD จึงสามารถนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชิงด้วยน้ำได้และน่าจะนำไปใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันต่างๆ ได้ ข้อดีของ FI-ECD คือ สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาน้อยโดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 27 ตัวอย่างภายใน 1 ชั่วโมง ไม่ต้องนำขั้วมาออกมาทำ pretreatment เพียงแต่ชะด้วย carrier และ flow น้ำ deionize water ในระบบหลังการวิเคราะห์แต่ละชุดเสร็จเท่านั้น

การเปรียบเทียบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ต่างๆ โดยใช้ F-test [37] แสดงค่า F ซึ่งเป็นอัตราส่วน variance จากแต่ละวิธีแสดงดังตารางที่ 57

ตารางที่ 57 ค่า F-test ของเทคนิค FI-ECD เทียบกับ ABTS assay, cyclic voltammetry, Folin-Denis assay สำหรับสารสกัดจากเนื้ออิงที่อุณหภูมิ 70 °C

เทคนิค	ABTS	CV	Folin-Denis	FI-ECD
ABTS	1.0	5.3	12.2	1.7
CV	5.3	1.0	2.3	3.1
Folin-Denis	12.2	2.3	1.0	7.1
FI-ECD	1.7	3.1	7.1	1.0

จากตารางที่ 57 พบว่าค่า F-test ที่คำนวณได้ที่อุณหภูมิ 70 °C มีค่าน้อยกว่าค่า critical values ของ  $F_{4,4}$  ซึ่งเท่ากับ 9.605 สรุปว่าเทคนิค FI-ECD นั้นมีความแปรปรวนไม่แตกต่างกับเทคนิค ABTS assay, cyclic voltammetry, Folin-Denis assay อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ในงานวิจัยนี้ผลการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันที่ได้จากวิธีต่างๆ เป็นการวิเคราะห์ที่สามารถบอกถึงปริมาณสัมพัทธ์ (relative value) ของสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ในสารสกัดจากอิงที่อุณหภูมิต่างๆ โดยในสารสกัดจากอิงที่สกัดด้วยตัวทำละลาย acetone : methanol : H<sub>2</sub>O (อัตราส่วน 7:7:6 โดยปริมาตร) พบว่าสารสกัดจากเนื้ออิงมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่าสารสกัดจากเปลือกอิง และเมื่อนำเนื้ออิงมาสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ แบบระบบปิดและแบบระบบเปิดพบว่า สารสกัดจากเนื้ออิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าเมื่อสกัดเนื้ออิงด้วยน้ำแบบระบบปิด น่าจะมาจากสารที่สามารถระเหยได้ที่เป็นส่วนประกอบในตัวอย่างนั้นอาจจะหายไปพร้อมกับน้ำ ดังนั้นสำหรับในชีวิตประจำวันการต้มน้ำอิงจึงควรปิดฝาเพื่อรักษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำอิงที่ต้มได้ และเมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดจึงด้วยก็พบว่าอุณหภูมิที่ใช้มีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันเช่นกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการต้มน้ำอิงจึงควรอยู่ที่อุณหภูมิ 70-80 °C

## เอกสารอ้างอิง

- [1] โอภา, วัชรกุลป์. (2005). สารต้านอนุมูลอิสระ พิมพ์ครั้งที่ 2, บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด, หน้า. 1.
- [2] Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathé, G. (2002). Polyphenol: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother*, 56, 200-207.
- [3] Shahidi, F., & Nazk, M. (2006). Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC PRESS LLC. p. 402.
- [4] <http://rx12.wsnhosting.com/herb/king.html> เข้าถึงเมื่อ 25 เมษายน พ.ศ. 2552
- [5] [http://ittm.dtam.moph.go.th/Service/herb\\_data/herb\\_ssm11.htm](http://ittm.dtam.moph.go.th/Service/herb_data/herb_ssm11.htm) เข้าถึงเมื่อ 25 เมษายน พ.ศ. 2552
- [6] <http://www.kasetonline.net/newsite/index.php?id=275> เข้าถึงเมื่อ 25 เมษายน พ.ศ. 2552
- [7] Ali, B. H., Blunden, G., Tanira, M. O., & Nemmar, A. (2008). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 409-420.
- [8] Variyar, P. S., Gholap, A. S., & Thomas, P. (2000). Estimation of Pungency in Fresh Ginger: A New Fluorimetric Assay. *Journal of food composition and analysis*, 13, 219-225.
- [9] He, X., Bernart, M. W., Lian, L., & Lin, L. (1998). High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of pungent constituents of ginger. *Journal of Chromatography A*, 796, 327-334.
- [10] Balladin, D. A., Headley, O., Chan-yen, I., & Mcgaw, D. (1997). Extraction and evaluation of the main pungent principles of solar dried west Indian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) rhizome. *Renewable Energy*, 12, 125-130.
- [11] Mansour, E.H., & Khalil, A.H. (2000). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. *Food Chemistry*, 69, 135-141.
- [12] Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
- [13] Stoilva, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., & Gargova, S. (2004). Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102, 764-770.

- [14] Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, *92*, 491-497.
- [15] Wang, J. (2000). *Analytical Electrochemistry* 2nd ed. Wiley & Sons Inc. p. 27.
- [16] Brett, C. M. A., & Brett, A. M. O. (1994). *Electrochemistry Principles Methods and Application* 2nd ed. Oxford University Press Inc. p.175.
- [17] Diopan, V., Babula, P., Shestivska, V., Adam, V., Zemlicka, M., Dvorska, K., Hubalek, J., Trnkova, L., Havel, L., & Kizek, R. (2008). Electrochemical and spectrometric study of antioxidant activity of pomiferin, isopomiferin, osajin and catalposide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *48*, 127 – 133.
- [18] Raymundo, M. D. S., Paula, M. M. D. S., Franco, C., & Fett, R. (2007). Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques. *LWT*, *40*, 1133-1139.
- [19] Kilmartin, P. A. (2001). *Antioxidants & Redox Signaling*, *3*, 941-955.
- [20] Sousa, W. R., Rocha, C. D., Cardoso, C. L., Silva, D. H. S., & Zanoni, M. V. B. (2004). Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of food composition and analysis*, *17*, 619-633.
- [21] Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Boas, M. V., & Ferreira, I. C. F. R. (2008). Antioxidant activity of Agaricus sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assay. *Food Chemistry*, *111*, 61-66.
- [22] Cosio, M. S., Buratti, S., Mannino, S., & Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food Chemistry*, *97*, 725-731.
- [23] Gunckel, S., Santander, P., Cordano G., Ferreira, J., Munoz, S., Nunez-Vergara, L. J., & Squella, J. A. (1998). Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. *Chemico-Biological Interactions*, *114*, 45-59.
- [24] Mu, S. (2003). The electrocatalytic oxidation of gallic acid on polyaniline film synthesized in the presence of ferrocene phosphonic acid. *Synthetic Metals*, *139*, 287-294.

- [25] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Evans, C. R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- [26] Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37, 277-288.
- [27] Munteanu, F. D., Basto, C., Gübitz, G. M., & Paulo, A. C. (2007). Stanong of wool using the reaction products of ABTS oxidation by Laccase: Synergetic effects of ultrasound and cyclic voltammetry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 363-367.
- [28] Erdemoglu, S. B., Pyrzyńska, K., & Güçer, S. (2000). *Analytica Chimica Acta*, 441, 81-89.
- [29] Ruzicka, J. (1982). Flow-injection methods: new tool for instrumental analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 305, 645-656.
- [30] Tang, B., Zhang, L., & Geng, Y. (2005). Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow injection spectrofluorimetry detecting hydroxyl radicals. *Talanta*, 65, 769-775.
- [31] Blasco, A. J., Regerio, M. C., González, M. C., & Escarpa, A. (2005). "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in food: A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 539, 237-244.
- [32] Milardovic, S., Kerekovic, I., Derrico, R., & Rumenjak, V. (2007). A novel method for flow injection analysis of total antioxidant capacity and biamperometric detector using enzymatically produced ABTS<sup>•+</sup> containing interdigitated delectrode. *Talanta*, 71, 213-220.
- [33] Erdemoğlu, S. B., Pyrzyńska, K., & Güçer S. (2000). Speciation of aluminum in tea infusion by ion-exchange resins and flame AAS detection. *Analytica Chimica Acta*, 41, 81-89
- [34] Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., González, I., & Viniegra-González, G. (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 579, 59-66.
- [35] Iveković, D., Milardović, S., Roboz, M., & Grabarić, B. S. (2005). Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *The Analyst*, 130, 708-714.

- [36] Gosser Jr. D. K. (1993). Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms, VCH Publishers. p. 43.
- [37] Miller, J. N., & Miller, J. C. (2005). Statistics and chemometrics for analytical chemistry 5 th ed. Pearson Education Limited. p. 49.

ภาคผนวก

การทดสอบทางสถิติของค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิดสำหรับเทคนิค

ABTS assay

Oneway

**Descriptives**

ABTSOPEN										
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance	
					Lower Bound	Upper Bound				
40	3	.7567	.00577	.00333	.7423	.7710	.75	.76		
50	3	1.1167	.06028	.03480	.9669	1.2664	1.06	1.18		
60	3	1.0200	.07000	.04041	.8461	1.1939	.94	1.07		
70	3	1.0967	.05132	.02963	.9692	1.2241	1.04	1.14		
80	3	.6300	.05292	.03055	.4986	.7614	.57	.67		
Total	15	.9240	.20698	.05344	.8094	1.0386	.57	1.18		
Model										
Fixed Effects										
Random Effects									.04671	

**ANOVA**

ABTSOPEN					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.572	4	.143	51.050	.000
Within Groups	.028	10	.003		
Total	.600	14			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: ABTSOPEN

	(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	40	50	-.3600*	.04320	.000	-.5212	-.1988
		60	-.2633*	.04320	.002	-.4245	-.1022
		70	-.3400*	.04320	.000	-.5012	-.1788
		80	.1267	.04320	.149	-.0345	.2878
	50	40	.3600*	.04320	.000	.1988	.5212
		60	.0967	.04320	.351	-.0645	.2578
		70	.0200	.04320	.994	-.1412	.1812
		80	.4867*	.04320	.000	.3255	.6478
	60	40	.2633*	.04320	.002	.1022	.4245
		50	-.0967	.04320	.351	-.2578	.0645
		70	-.0767	.04320	.559	-.2378	.0845
		80	.3900*	.04320	.000	.2288	.5512
	70	40	.3400*	.04320	.000	.1788	.5012
		50	-.0200	.04320	.994	-.1812	.1412
		60	.0767	.04320	.559	-.0845	.2378
		80	.4667*	.04320	.000	.3055	.6278
80	40	-.1267	.04320	.149	-.2878	.0345	
	50	-.4867*	.04320	.000	-.6478	-.3255	
	60	-.3900*	.04320	.000	-.5512	-.2288	
	70	-.4667*	.04320	.000	-.6278	-.3055	
LSD	40	50	-.3600*	.04320	.000	-.4563	-.2637
		60	-.2633*	.04320	.000	-.3596	-.1671
		70	-.3400*	.04320	.000	-.4363	-.2437
		80	.1267*	.04320	.015	.0304	.2229
	50	40	.3600*	.04320	.000	.2637	.4563
		60	.0967*	.04320	.049	.0004	.1929
		70	.0200	.04320	.653	-.0763	.1163
		80	.4867*	.04320	.000	.3904	.5829
	60	40	.2633*	.04320	.000	.1671	.3596
		50	-.0967*	.04320	.049	-.1929	-.0004
		70	-.0767	.04320	.106	-.1729	.0196
		80	.3900*	.04320	.000	.2937	.4863
	70	40	.3400*	.04320	.000	.2437	.4363
		50	-.0200	.04320	.653	-.1163	.0763
		60	.0767	.04320	.106	-.0196	.1729
		80	.4667*	.04320	.000	.3704	.5629
80	40	-.1267*	.04320	.015	-.2229	-.0304	
	50	-.4867*	.04320	.000	-.5829	-.3904	
	60	-.3900*	.04320	.000	-.4863	-.2937	
	70	-.4667*	.04320	.000	-.5629	-.3704	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Homogeneous Subsets

**ABTSOPEN**

	TEMP	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Scheffe <sup>a</sup>	80	3	.6300	
	40	3	.7567	
	60	3		1.0200
	70	3		1.0967
	50	3		1.1167
	Sig.			.149

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การทดสอบทางสถิติของค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด สำหรับเทคนิค

ABTS assay

Oneway

**Descriptives**

ABTSCLOS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
40	5	1.8520	.15675	.07010	1.6574	2.0466	1.70	2.11	
50	5	1.9900	.07483	.03347	1.8971	2.0829	1.90	2.10	
60	5	2.0300	.30586	.13678	1.6502	2.4098	1.54	2.30	
70	5	2.2480	.19992	.08941	1.9998	2.4962	1.98	2.49	
80	5	2.1400	.17664	.07899	1.9207	2.3593	1.96	2.41	
Total	25	2.0520	.22657	.04531	1.9585	2.1455	1.54	2.49	
Model				.19743	.03949	1.9696	2.1344		
Fixed Effects					.06726	1.8652	2.2388		
Random Effects									.01483

**ANOVA**

ABTSCLOS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.452	4	.113	2.902	.048
Within Groups	.780	20	.039		
Total	1.232	24			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: ABTSCLOS

LSD

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.1380	.12486	.282	-.3985	.1225
	60	-.1780	.12486	.169	-.4385	.0825
	70	-.3960*	.12486	.005	-.6565	-.1355
	80	-.2880*	.12486	.032	-.5485	-.0275
50	40	.1380	.12486	.282	-.1225	.3985
	60	-.0400	.12486	.752	-.3005	.2205
	70	-.2580	.12486	.052	-.5185	.0025
	80	-.1500	.12486	.244	-.4105	.1105
60	40	.1780	.12486	.169	-.0825	.4385
	50	.0400	.12486	.752	-.2205	.3005
	70	-.2180	.12486	.096	-.4785	.0425
	80	-.1100	.12486	.389	-.3705	.1505
70	40	.3960*	.12486	.005	.1355	.6565
	50	.2580	.12486	.052	-.0025	.5185
	60	.2180	.12486	.096	-.0425	.4785
	80	.1080	.12486	.397	-.1525	.3685
80	40	.2880*	.12486	.032	.0275	.5485
	50	.1500	.12486	.244	-.1105	.4105
	60	.1100	.12486	.389	-.1505	.3705
	70	-.1080	.12486	.397	-.3685	.1525

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: ABTSCLOS

Scheffe

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.1380	.12486	.871	-.5608	.2848
	60	-.1780	.12486	.730	-.6008	.2448
	70	-.3960	.12486	.074	-.8188	.0268
	80	-.2880	.12486	.293	-.7108	.1348
50	40	.1380	.12486	.871	-.2848	.5608
	60	-.0400	.12486	.999	-.4628	.3828
	70	-.2580	.12486	.399	-.6808	.1648
	80	-.1500	.12486	.834	-.5728	.2728
60	40	.1780	.12486	.730	-.2448	.6008
	50	.0400	.12486	.999	-.3828	.4628
	70	-.2180	.12486	.562	-.6408	.2048
	80	-.1100	.12486	.939	-.5328	.3128
70	40	.3960	.12486	.074	-.0268	.8188
	50	.2580	.12486	.399	-.1648	.6808
	60	.2180	.12486	.562	-.2048	.6408
	80	.1080	.12486	.942	-.3148	.5308
80	40	.2880	.12486	.293	-.1348	.7108
	50	.1500	.12486	.834	-.2728	.5728
	60	.1100	.12486	.939	-.3128	.5328
	70	-.1080	.12486	.942	-.5308	.3148

### ABTSCLOS

Scheffe

TEMP	N	Subset for alpha = .05
		1
40	5	1.8520
50	5	1.9900
60	5	2.0300
80	5	2.1400
70	5	2.2480
Sig.		.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

การทดสอบทางสถิติของค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบเปิด สำหรับเทคนิค

CV

Oneway

**Descriptives**

CVOPEN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
40	3	.85010	.087712	.050641	.63221	1.06799	.778	.948	
50	3	.54913	.089662	.051767	.32640	.77187	.446	.601	
60	3	.56190	.128049	.073929	.24381	.87999	.419	.665	
70	3	.53310	.124783	.072043	.22312	.84308	.389	.611	
80	3	.20923	.007246	.004183	.19123	.22723	.201	.215	
Total	15	.54069	.225837	.058311	.41563	.66576	.201	.948	
Model			.097727	.025233	.48447	.59692			
Fixed Effects									
Random Effects				.101532	.25879	.82259			.048361

**ANOVA**

CVOPEN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.619	4	.155	16.191	.000
Within Groups	.096	10	.010		
Total	.714	14			

**Post Hoc Tests**

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: CVOPEN

LSD

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	.30097*	.079794	.004	.12318	.47876
	60	.28820*	.079794	.005	.11041	.46599
	70	.31700*	.079794	.003	.13921	.49479
	80	.64087*	.079794	.000	.46308	.81866
50	40	-.30097*	.079794	.004	-.47876	-.12318
	60	-.01277	.079794	.876	-.19056	.16502
	70	.01603	.079794	.845	-.16176	.19382
	80	.33990*	.079794	.002	.16211	.51769
60	40	-.28820*	.079794	.005	-.46599	-.11041
	50	.01277	.079794	.876	-.16502	.19056
	70	.02880	.079794	.726	-.14899	.20659
	80	.35267*	.079794	.001	.17488	.53046
70	40	-.31700*	.079794	.003	-.49479	-.13921
	50	-.01603	.079794	.845	-.19382	.16176
	60	-.02880	.079794	.726	-.20659	.14899
	80	.32387*	.079794	.002	.14608	.50166
80	40	-.64087*	.079794	.000	-.81866	-.46308
	50	-.33990*	.079794	.002	-.51769	-.16211
	60	-.35267*	.079794	.001	-.53046	-.17488
	70	-.32387*	.079794	.002	-.50166	-.14608

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: CVOPEN

Scheffe

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	.30097*	.079794	.047	.00334	.59859
	60	.28820	.079794	.059	-.00942	.58582
	70	.31700*	.079794	.036	.01938	.61462
	80	.64087*	.079794	.000	.34324	.93849
50	40	-.30097*	.079794	.047	-.59859	-.00334
	60	-.01277	.079794	1.000	-.31039	.28486
	70	.01603	.079794	1.000	-.28159	.31366
	80	.33990*	.079794	.024	.04228	.63752
60	40	-.28820	.079794	.059	-.58582	.00942
	50	.01277	.079794	1.000	-.28486	.31039
	70	.02880	.079794	.998	-.26882	.32642
	80	.35267*	.079794	.019	.05504	.65029
70	40	-.31700*	.079794	.036	-.61462	-.01938
	50	-.01603	.079794	1.000	-.31366	.28159
	60	-.02880	.079794	.998	-.32642	.26882
	80	.32387*	.079794	.032	.02624	.62149
80	40	-.64087*	.079794	.000	-.93849	-.34324
	50	-.33990*	.079794	.024	-.63752	-.04228
	60	-.35267*	.079794	.019	-.65029	-.05504
	70	-.32387*	.079794	.032	-.62149	-.02624

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### CVOPEN

Scheffe<sup>a</sup>

TEMP	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
80	3	.20923		
70	3		.53310	
50	3		.54913	
60	3		.56190	.56190
40	3			.85010
Sig.		1.000	.998	.059

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การทดสอบทางสถิติของค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด สำหรับเทคนิค CV

### Oneway

#### Descriptives

CVCLOSE

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
40	5	.63700	.048616	.021742	.57664	.69736	.573	.704	
50	5	.84460	.098249	.043938	.72261	.96659	.693	.945	
60	5	.94060	.120357	.053825	.79116	1.09004	.811	1.128	
70	5	1.10520	.086866	.038848	.99734	1.21306	.992	1.210	
80	5	.91660	.033065	.014787	.87554	.95766	.879	.966	
Total	25	.88880	.173058	.034612	.81737	.96023	.573	1.210	
Model Fixed Effects			.083834	.016767	.85382	.92378			
Random Effects				.076040	.67768	1.09992			.027505

#### ANOVA

CVCLOSE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.578	4	.145	20.567	.000
Within Groups	.141	20	.007		
Total	.719	24			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: CVCLOSE

Scheffe

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.20760*	.053022	.018	-.38713	-.02807
	60	-.30360*	.053022	.000	-.48313	-.12407
	70	-.46820*	.053022	.000	-.64773	-.28867
	80	-.27960*	.053022	.001	-.45913	-.10007
50	40	.20760*	.053022	.018	.02807	.38713
	60	-.09600	.053022	.528	-.27553	.08353
	70	-.26060*	.053022	.002	-.44013	-.08107
	80	-.07200	.053022	.763	-.25153	.10753
60	40	.30360*	.053022	.000	.12407	.48313
	50	.09600	.053022	.528	-.08353	.27553
	70	-.16460	.053022	.083	-.34413	.01493
	80	.02400	.053022	.995	-.15553	.20353
70	40	.46820*	.053022	.000	.28867	.64773
	50	.26060*	.053022	.002	.08107	.44013
	60	.16460	.053022	.083	-.01493	.34413
	80	.18860*	.053022	.036	.00907	.36813
80	40	.27960*	.053022	.001	.10007	.45913
	50	.07200	.053022	.763	-.10753	.25153
	60	-.02400	.053022	.995	-.20353	.15553
	70	-.18860*	.053022	.036	-.36813	-.00907

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### CVCLOSE

Scheffe<sup>a</sup>

TEMP	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
40	5	.63700		
50	5		.84460	
80	5		.91660	
60	5		.94060	.94060
70	5			1.10520
Sig.		1.000	.528	.083

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: CVCLOSE

LSD

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.20760*	.053022	.001	-.31820	-.09700
	60	-.30360*	.053022	.000	-.41420	-.19300
	70	-.46820*	.053022	.000	-.57880	-.35760
	80	-.27960*	.053022	.000	-.39020	-.16900
50	40	.20760*	.053022	.001	.09700	.31820
	60	-.09600	.053022	.085	-.20660	.01460
	70	-.26060*	.053022	.000	-.37120	-.15000
	80	-.07200	.053022	.190	-.18260	.03860
60	40	.30360*	.053022	.000	.19300	.41420
	50	.09600	.053022	.085	-.01460	.20660
	70	-.16460*	.053022	.006	-.27520	-.05400
	80	.02400	.053022	.656	-.08660	.13460
70	40	.46820*	.053022	.000	.35760	.57880
	50	.26060*	.053022	.000	.15000	.37120
	60	.16460*	.053022	.006	.05400	.27520
	80	.18860*	.053022	.002	.07800	.29920
80	40	.27960*	.053022	.000	.16900	.39020
	50	.07200	.053022	.190	-.03860	.18260
	60	-.02400	.053022	.656	-.13460	.08660
	70	-.18860*	.053022	.002	-.29920	-.07800

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

การทดสอบทางสถิติของค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบ สำหรับเทคนิค

Folin-Denis assay

Oneway

**Descriptives**

FOLINOPE

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
40	3	.3067	.03215	.01856	.2268	.3865	.27	.33	
50	3	.3167	.01528	.00882	.2787	.3546	.30	.33	
60	3	.3200	.01000	.00577	.2952	.3448	.31	.33	
70	3	.3867	.01155	.00667	.3580	.4154	.38	.40	
80	3	.3467	.01528	.00882	.3087	.3846	.33	.36	
Total	15	.3353	.03378	.00872	.3166	.3540	.27	.40	
Model				.00481	.3246	.3460			
Fixed Effects				.01444	.2952	.3754			
Random Effects									.00093

**ANOVA**

FOLINOPE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.013	4	.003	9.019	.002
Within Groups	.003	10	.000		
Total	.016	14			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: FOLINOPE

Scheffe

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.0100	.01520	.977	-.0667	.0467
	60	-.0133	.01520	.937	-.0700	.0434
	70	-.0800*	.01520	.006	-.1367	-.0233
	80	-.0400	.01520	.219	-.0967	.0167
50	40	.0100	.01520	.977	-.0467	.0667
	60	-.0033	.01520	1.000	-.0600	.0534
	70	-.0700*	.01520	.015	-.1267	-.0133
	80	-.0300	.01520	.464	-.0867	.0267
60	40	.0133	.01520	.937	-.0434	.0700
	50	.0033	.01520	1.000	-.0534	.0600
	70	-.0667*	.01520	.020	-.1234	-.0100
	80	-.0267	.01520	.569	-.0834	.0300
70	40	.0800*	.01520	.006	.0233	.1367
	50	.0700*	.01520	.015	.0133	.1267
	60	.0667*	.01520	.020	.0100	.1234
	80	.0400	.01520	.219	-.0167	.0967
80	40	.0400	.01520	.219	-.0167	.0967
	50	.0300	.01520	.464	-.0267	.0867
	60	.0267	.01520	.569	-.0300	.0834
	70	-.0400	.01520	.219	-.0967	.0167

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

### FOLINOPE

Scheffe<sup>a</sup>

TEMP	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
40	3	.3067	
50	3	.3167	
60	3	.3200	
80	3	.3467	.3467
70	3		.3867
Sig.		.219	.219

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: FOLINOPE

LSD

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.0100	.01520	.526	-.0439	.0239
	60	-.0133	.01520	.401	-.0472	.0205
	70	-.0800*	.01520	.000	-.1139	-.0461
	80	-.0400*	.01520	.025	-.0739	-.0061
50	40	.0100	.01520	.526	-.0239	.0439
	60	-.0033	.01520	.831	-.0372	.0305
	70	-.0700*	.01520	.001	-.1039	-.0361
	80	-.0300	.01520	.077	-.0639	.0039
60	40	.0133	.01520	.401	-.0205	.0472
	50	.0033	.01520	.831	-.0305	.0372
	70	-.0667*	.01520	.001	-.1005	-.0328
	80	-.0267	.01520	.110	-.0605	.0072
70	40	.0800*	.01520	.000	.0461	.1139
	50	.0700*	.01520	.001	.0361	.1039
	60	.0667*	.01520	.001	.0328	.1005
	80	.0400*	.01520	.025	.0061	.0739
80	40	.0400*	.01520	.025	.0061	.0739
	50	.0300	.01520	.077	-.0039	.0639
	60	.0267	.01520	.110	-.0072	.0605
	70	-.0400*	.01520	.025	-.0739	-.0061

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

การทดสอบทางสถิติของค่า GAE ของสารสกัดจากเนื้อขิงด้วยน้ำแบบระบบปิด สำหรับเทคนิค

Folin-Denis assay

Oneway

#### Descriptives

FOLINCLO		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
		5	.9560	.04099	.01833	.9051	1.0069	.92	1.01	
		5	1.0880	.04025	.01800	1.0380	1.1380	1.03	1.13	
		5	1.1100	.10075	.04506	.9849	1.2351	.96	1.21	
		5	1.3680	.05718	.02557	1.2970	1.4390	1.32	1.43	
		5	1.2820	.09284	.04152	1.1667	1.3973	1.16	1.38	
Total		25	1.1608	.16312	.03262	1.0935	1.2281	.92	1.43	
Model	Fixed Effects			.07119	.01424	1.1311	1.1905			
	Random Effects				.07330	.9573	1.3643			.02585

**ANOVA**

FOLINCLO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.537	4	.134	26.501	.000
Within Groups	.101	20	.005		
Total	.639	24			

**Post Hoc Tests****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: FOLINCLO

LSD

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.1320*	.04502	.008	-.2259	-.0381
	60	-.1540*	.04502	.003	-.2479	-.0601
	70	-.4120*	.04502	.000	-.5059	-.3181
	80	-.3260*	.04502	.000	-.4199	-.2321
50	40	.1320*	.04502	.008	.0381	.2259
	60	-.0220	.04502	.630	-.1159	.0719
	70	-.2800*	.04502	.000	-.3739	-.1861
	80	-.1940*	.04502	.000	-.2879	-.1001
60	40	.1540*	.04502	.003	.0601	.2479
	50	.0220	.04502	.630	-.0719	.1159
	70	-.2580*	.04502	.000	-.3519	-.1641
	80	-.1720*	.04502	.001	-.2659	-.0781
70	40	.4120*	.04502	.000	.3181	.5059
	50	.2800*	.04502	.000	.1861	.3739
	60	.2580*	.04502	.000	.1641	.3519
	80	.0860	.04502	.071	-.0079	.1799
80	40	.3260*	.04502	.000	.2321	.4199
	50	.1940*	.04502	.000	.1001	.2879
	60	.1720*	.04502	.001	.0781	.2659
	70	-.0860	.04502	.071	-.1799	.0079

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: FOLINCLO

Scheffe

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.1320	.04502	.112	-.2844	.0204
	60	-.1540*	.04502	.047	-.3064	-.0016
	70	-.4120*	.04502	.000	-.5644	-.2596
	80	-.3260*	.04502	.000	-.4784	-.1736
50	40	.1320	.04502	.112	-.0204	.2844
	60	-.0220	.04502	.993	-.1744	.1304
	70	-.2800*	.04502	.000	-.4324	-.1276
	80	-.1940*	.04502	.008	-.3464	-.0416
60	40	.1540*	.04502	.047	.0016	.3064
	50	.0220	.04502	.993	-.1304	.1744
	70	-.2580*	.04502	.000	-.4104	-.1056
	80	-.1720*	.04502	.022	-.3244	-.0196
70	40	.4120*	.04502	.000	.2596	.5644
	50	.2800*	.04502	.000	.1276	.4324
	60	.2580*	.04502	.000	.1056	.4104
	80	.0860	.04502	.476	-.0664	.2384
80	40	.3260*	.04502	.000	.1736	.4784
	50	.1940*	.04502	.008	.0416	.3464
	60	.1720*	.04502	.022	.0196	.3244
	70	-.0860	.04502	.476	-.2384	.0664

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Homogeneous Subsets

#### FOLINCLO

Scheffe<sup>a</sup>

TEMP	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
40	5	.9560		
50	5	1.0880	1.0880	
60	5		1.1100	
80	5			1.2820
70	5			1.3680
Sig.		.112	.993	.476

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

การทดสอบทางสถิติของค่า GAE ของสารสกัดจากขิงด้วยน้ำแบบปิดฝา สำหรับเทคนิค FI-ECD

Oneway

Descriptives

FOLINCLO

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
40	5	.9560	.04099	.01833	.9051	1.0069	.92	1.01	
50	5	1.0880	.04025	.01800	1.0380	1.1380	1.03	1.13	
60	5	1.1100	.10075	.04506	.9849	1.2351	.96	1.21	
70	5	1.3680	.05718	.02557	1.2970	1.4390	1.32	1.43	
80	5	1.2820	.09284	.04152	1.1667	1.3973	1.16	1.38	
Total	25	1.1608	.16312	.03262	1.0935	1.2281	.92	1.43	
Model									
Fixed Effects			.07119	.01424	1.1311	1.1905			
Random Effects				.07330	.9573	1.3643			.02585

ANOVA

FOLINCLO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.537	4	.134	26.501	.000
Within Groups	.101	20	.005		
Total	.639	24			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: FOLINCLO

Scheffe

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.1320	.04502	.112	-.2844	.0204
	60	-.1540*	.04502	.047	-.3064	-.0016
	70	-.4120*	.04502	.000	-.5644	-.2596
	80	-.3260*	.04502	.000	-.4784	-.1736
50	40	.1320	.04502	.112	-.0204	.2844
	60	-.0220	.04502	.993	-.1744	.1304
	70	-.2800*	.04502	.000	-.4324	-.1276
	80	-.1940*	.04502	.008	-.3464	-.0416
60	40	.1540*	.04502	.047	.0016	.3064
	50	.0220	.04502	.993	-.1304	.1744
	70	-.2580*	.04502	.000	-.4104	-.1056
	80	-.1720*	.04502	.022	-.3244	-.0196
70	40	.4120*	.04502	.000	.2596	.5644
	50	.2800*	.04502	.000	.1276	.4324
	60	.2580*	.04502	.000	.1056	.4104
	80	.0860	.04502	.476	-.0664	.2384
80	40	.3260*	.04502	.000	.1736	.4784
	50	.1940*	.04502	.008	.0416	.3464
	60	.1720*	.04502	.022	.0196	.3244
	70	-.0860	.04502	.476	-.2384	.0664

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

### FOLINCLO

Scheffe<sup>a</sup>

TEMP	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
40	5	.9560		
50	5	1.0880	1.0880	
60	5		1.1100	
80	5			1.2820
70	5			1.3680
Sig.		.112	.993	.476

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: FOLINCLO

LSD

(I) TEMP	(J) TEMP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
40	50	-.1320*	.04502	.008	-.2259	-.0381
	60	-.1540*	.04502	.003	-.2479	-.0601
	70	-.4120*	.04502	.000	-.5059	-.3181
	80	-.3260*	.04502	.000	-.4199	-.2321
50	40	.1320*	.04502	.008	.0381	.2259
	60	-.0220	.04502	.630	-.1159	.0719
	70	-.2800*	.04502	.000	-.3739	-.1861
	80	-.1940*	.04502	.000	-.2879	-.1001
60	40	.1540*	.04502	.003	.0601	.2479
	50	.0220	.04502	.630	-.0719	.1159
	70	-.2580*	.04502	.000	-.3519	-.1641
	80	-.1720*	.04502	.001	-.2659	-.0781
70	40	.4120*	.04502	.000	.3181	.5059
	50	.2800*	.04502	.000	.1861	.3739
	60	.2580*	.04502	.000	.1641	.3519
	80	.0860	.04502	.071	-.0079	.1799
80	40	.3260*	.04502	.000	.2321	.4199
	50	.1940*	.04502	.000	.1001	.2879
	60	.1720*	.04502	.001	.0781	.2659
	70	-.0860	.04502	.071	-.1799	.0079

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

การหาความสัมพันธ์ค่า GAE จากแต่ละวิธี

## Correlations

Correlations

		ABTS	CV	FOLIN	FI_ECD
ABTS	Pearson Correlation	1	.952*	.992**	.954*
	Sig. (2-tailed)	.	.013	.001	.012
	N	5	5	5	5
CV	Pearson Correlation	.952*	1	.906*	.825
	Sig. (2-tailed)	.013	.	.034	.086
	N	5	5	5	5
FOLIN	Pearson Correlation	.992**	.906*	1	.981**
	Sig. (2-tailed)	.001	.034	.	.003
	N	5	5	5	5
FI_ECD	Pearson Correlation	.954*	.825	.981**	1
	Sig. (2-tailed)	.012	.086	.003	.
	N	5	5	5	5

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวอังก์วรา พูลเกษม  
ที่อยู่ 345/4 หมู่ที่ 1 ตำบลลาดหญ้า อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี  
71190

### ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกเคมี  
จากมหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม  
พ.ศ. 2549 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเคมีวิเคราะห์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

### การเสนอผลงานวิจัย

#### ระดับนานาชาติ

1. A. Poolkasem, R. Chaisuksant “Antioxidant analysis of ginger rootstock by cyclic voltammetry”, Poster presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2008, January 30–February 1, 2008, Sofitel Centara Grand Bangkok, Bangkok, Thailand

#### ระดับประเทศ

1. A. Poolkasem, R. Chaisuksant “Temperature effect on antioxidant capacity of ginger infusion”, Poster presentation, 34th Congress on Science and Technology of Thailand, October 30–November 2, 2008, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.