การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรากผักหวานป่า

ทักษพร พรมแก้วต่อ

การศึกษาอิสระ เสนอเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
เมษายน 2563
มหาวิทยาลัยพะเยา
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

คณะกรรมการสอบการศึกษาอิสระ อาจารย์ที่ปรึกษา และคณบดีคณะวิทยาศาสตร์ ได้พิจารณาการศึกษา เรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรากผักหวานป่า” เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี ของมหาวิทยาลัย

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัลยา จำปาทอง)

ประธานกรรมการ

.....

(ดร.ชัยพัฒน์ ลาพินี)

กรรมการ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ นาสมใจ)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชยันต์ บุณยรักษ์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

เมษายน 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผศ. ดร.พิทักษ์ นาสมใจ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ได้ให้การชี้แนะ วิธีการทำงานงานวิจัย ตลอดจนให้การสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี และอีกทั้งยังได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้ข้าพเจ้าได้สอบถาม ปรึกษา พร้อมทั้งให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมถึงช่วยแก้ไขข้อบกพร่อง ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยในครั้งนี้มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.กัลยา จำปาทอง และ ดร.ชัยพัฒน์ ลาพินี ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาร่วมเป็นกรรมการในการสอบครั้งนี้ พร้อมทั้งตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง และให้ข้อเสนอแนะเพื่อการพัฒนาในลำดับต่อไป

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความกรุณาช่วยเหลือ อนุเคราะห์ในด้าน เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี รวมทั้งให้การอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการเคมีในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดียิ่ง

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และน้องสาวที่คอยช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านเป็นอย่างดียิ่งเสมอมา และทำให้งานวิจัยครั้งนี้บรรลุผลสำเร็จด้วยดี

และขอบขอบพระคุณเพื่อน ๆ ที่คอยให้กำลังใจ และให้การช่วยเหลือในการทำงานด้วยดีเสมอมา

ทักษพร พรมแก้วต่อ

ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกิ่งผักหวานป่า

ผู้ศึกษาค้นคว้า นางสาวทักษพร พรมแก้วต่อ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ นาสมใจ

คำสำคัญ ผักหวานป่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS ปริมาณฟีนอลิกรวม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์หาปริมาณ ฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่าที่ได้จากการสกัดรากผักหวานแห้งน้ำหนัก 400 กรัม ด้วย 85% เอทานอล ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นจึงกรองสารละลาย นำสารลายละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนจะได้สารสกัดหยาบครั้งที่ 1 นำส่วนกากจากการกรองไปแช่ 85% เอทานอล และทำซ้ำขั้นตอนอีก 2 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบน้ำหนักรวม 10.5 กรัม ส่วนสกัดหยาบถูกนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS และวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากผักหวานป่าโดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2904.55 พีพีเอ็ม ขณะที่สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 1.30 พีพีเอ็ม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS มีค่า TEAC เท่ากับ 1.04 มิลลิโมลาร์ ปริมาณฟีนอลิกรวมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยวิธี Folin–Ciocalteu colorimetric assay มีค่าเท่ากับ 0.56 mg GAE/gDW

Title STUDY ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OAND TOTAL PHENOLIC CONTENTS OF CRUDE EXTRACT OF TWIGS OF MELIENTHA SUAVIS PIERRE

Author Miss Taksaporn Promkaewtor

Advisor Asst. Prof. Dr. Pitak Nasomjai

Bachelor of Science Program in Chemistry

Keywords *Melientha suavis Pierre,* Antioxidant activity, DPPH, ABTS, and Total phenolic content

ABSTRACT

This research aimed to study the antioxidant activities and total phenolic contents in *Melientha suavis Pierre* root extract. 400 g of dried twigs of M. *suavis Pierre* was ground into powder and was extracted with 85% ethanol. After leaving for 1 day, the extract was filtered and solvents were evaporated off under reduced pressure to give the crude extract. The process was repeated twice to give 10.5 g of the crude extract. Antioxidant activities were evaluated with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS)assays. Total phenolic content was determined using Folin-ciocalteu colorimetric assay. The crude extract showed antioxidant activity with IC_{50} value of 2904.55 ppm in DPPH assay while the standard ascorbic acid showed an IC_{50} of 1.30 ppm. In ABTS assay, the TEAC of the crude extract was 1.04 mM. Total phenolic content of the crude extract was 0.56 mg GAE/gW.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ข

บทคัดย่อ ค

ABSTRACT ง

สารบัญ จ

สารบัญรูป ญ

สารบัญตาราง ฏ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ฏ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย 2

1.4 ขอบเขตการศึกษาของงานวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของงานวิจัย 3

บทที่ 2 4

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ผักหวานป่า 4

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 4

2.1.2 การใช้ประโยชน์ 5

2.2 การเตรียมพืช 5

2.2.1 การคัดเลือกพืช 5

2.2.2 การเก็บพืช 5

2.2.3 การเตรียมพืชก่อนการสกัด 6

2.3 การสกัดสารสำคัญออกจากพืช 6

1. การหมัก (Maceration) 6

2. การสกัด (Soxhlet Extraction) 6

2.4 อนุมูลอิสระ 7

2.4.1 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ 7

2.4.2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง 7

2.4.3 อนุมูลอิสระและการเกิดโรค 8

2.4.4 การป้องกันอนุมูลอิสระ 8

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ 9

2.5.1 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ 9

2.5.2 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ 10

2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 12

2.6.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH 12

2.6.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS 12

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu 13

บทที่ 3 14

วิธีการดำเนินการวิจัย 14

3.1 เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์ 14

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 14

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 14

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 15

3.2 วัตถุดิบ 15

3.3 การเตรียมตัวอย่างผักหวานป่า 16

3.4 การสกัดผักหวานป่า 16

3.5 การเตรียมสารละลาย (Stock Solution) ที่ใช้ในการทดสอบ DPPH 16

3.5.1 การเตรียมสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ radical 16

3.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic acid) 16

3.5.3 การเตรียมสารละลายจากส่วนสกัดหยาบ 16

3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 17

3.6.1 วิธีการหาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{MAX}) ของวิธี DPPH 17

3.6.2 วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic acid) 17

3.6.3 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบ 18

รากผักหวานป่า 18

3.7 การเตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 19

ABTS 19

3.7.1 การเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ reagent 19

3.7.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ 19

3.7.3 การเตรียมสารละลายสารสกัดรากผักหวานป่า 20

3.7.4 วิธีการหาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{MAX}) ของวิธี ABTS 20

3.7.5 วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ 20

3.7.6 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า 21

3.8 การเตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay 22

3.8.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 22

3.8.2 การเตรียมสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า 22

3.8.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (w/v) 22

3.8.4 การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v) 22

3.8.5 วิธีการหาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{MAX}) ของวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay 22

3.8.6 วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิก 23

3.8.7 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบผักหวานป่า 23

บทที่ 4 24

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 24

4.1 การสกัดรากผักหวานป่า 24

4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH 25

4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การด้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS 29

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay 31

บทที่ 5 34

สรุปผลการดำเนินการวิจัย 34

5.1 สรุปผลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวม 34

5.2 ข้อเสนอแนะ 34

บรรณาณุกรม 35

ภาคผนวก 36

ประวัติผู้วิจัย 46

สารบัญรูป

รูปที่ 1 ลักษณะต้นผักหวานป่า (ก) และดอกผักหวานป่า (ข) 5

รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกกับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ 27

รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกกับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ในช่วงความเข้มข้นต่ำ 27

รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ 28

รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่ากับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ในช่วงความเข้มข้นต่ำ 29

รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโทรลอกซ์กับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ 30

รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของกรดแกลลิกหลังทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu 32

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง 7
ตารางที่ 2 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 10
ตารางที่ 3 สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ 11
ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกรดแอสคอบิกทำปฏิกิริยากับสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ 25
ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากผักหวานป่าทำปฏิกิริยากับสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ 26
ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโทรลอกซ์ทำปฏิกิริยากับ
สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 30
ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโทรลอกซ์ทำปฏิกิริยากับ
สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 31
ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 751 nm ของสารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้นต่าง ๆ
เมื่อทำปฏิกิริยากับ Folin – Ciocalteu reagent 31
ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 751 nm ของสารละลายสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า 32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
ppm	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
DPPH	=	2,2-dipheny-1-picrylhdrazyl
ABTS	=	2,2-azion-bis-3-ehtylbenzothiazoline-6-sul-phonic acid
IC_{50}	=	50% inhibitory concentration
TEAC	=	Trolox Equivalent Antioxidant capacity
SD	=	Standard deviation
GAE	=	Gallic acid equivalent
FCR	=	Folin-Ciocalteu reagent
mM	=	มิลลิโมลาร์
Abs	=	Absorbance

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของการวิจัย

อนุมูลอิสระ สามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น เกิดจากการเผาผลาญพลังงานตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย หรือ เกิดจากปัจจัยจากภายนอก ได้แก่ มลพิษในอากาศโอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมม่า เป็นส่วนหนึ่งในการทำงานของระบบภายในร่างกาย แต่หากว่าเมื่อร่างกายของคนเรามีอนุมูลอิสระที่มีความเข้มสูงเกินกว่าที่ร่างกายจะรับได้ อนุมูลอิสระที่มีปริมาณสูงนั้นจะเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายและเป็นภาวะการทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคแก่ก่อนวัย โรคต้อกระจก และโรคอื่น ๆ เช่น อนุมูลอิสระจะทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลาย จะทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด แต่ถ้าเราได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปป้องกันหรือแย่งที่จับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้น ไปทิ้งนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย (Ames et. al., 1993)

การทำลายอนุมูลอิสระหรือการควบคุมปริมาณของอนุมูลอิสระ จึงมีความจำเป็นต่อมนุษย์ ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคร้ายต่าง ๆ ที่จะเกิดขึ้นได้ โดยปกติคนเรามีสารต้านอนุมูลอิสระตั้งแต่กำเนิด เมื่อถึงในช่วงวัยเด็กและวัยรุ่นนั้น ร่างกายของคนเราสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี แต่เมื่อคนเราได้เข้าสู่ในสภาวะของวัยทำงาน การใส่ใจและการดูแลร่างกายของคนเราจะลดน้อยลงเรื่อย ๆ เมื่อคนเรามีอายุที่เพิ่มมากขึ้น ร่างกายอ่อนแอ มีความเครียด ร่างกายที่สามารถผลิตภูมิคุ้มกันเองได้ ก็จะไม่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อต่อสู้ได้

ปัจจุบันการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในผลไม้และพืช มีมากขึ้นตามลำดับ เนื่องจากมีการค้นพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระส่วนมากจะอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งพบมากใน พืชผัก และผลไม้ จึงเป็นอีกทางเลือดหนึ่งในการศึกษาและพัฒนาการใช้ประโยชน์สารต้านอนุมูลอิสระ

ผักหวาน เป็นพืชวงศ์ Opiliaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Melientha suavis Pierre.* เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย ลาว เวียดนาม และกัมพูชา โดยมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เป็นพืชชนิดหนึ่งที่นิยมนำมารับประทานในแบบผักปกติและในแบบสมุนไพรเพื่อรักษาโรคต่าง ๆ ผักหวาน

ป่ามีสรรพคุณหลากหลายชนิด เช่น มีโปรตีน วิตามินสูง ช่วยลดอาการเลือดออกตามไรฟัน และช่วยให้ระบบขับถ่ายทำงานได้ดี แก้ร้อนในกระหายน้ำ และทำให้รู้สึกชุ่มขึ้น ใบและราก สามารถนำมาตำเพื่อรักษาแผลได้ ช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น เมื่อผักหวานมีคุณประโยชน์มากมายเหล่านี้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าน่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในผักหวานที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพได้ (สงบ, 2554)

การศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่า เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านเภสัชวิทยา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่า โดยใช้วิธี DPPH

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่า โดยใช้วิธี ABTS

1.2.3 เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่า ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย

1.3.1 หากส่วนสกัดหยาบรากผักหวานมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอยู่จริง เมื่อนำมาทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH จะเกิดการฟอกจางสีจากสีม่วงของสารละลาย DPPH* radical เปลี่ยนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส และสามารถตรวจสอบปริมาณโดยการใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรีได้

1.3.2 หากสารสกัดรากผักหวานป่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอยู่จริง เมื่อนำมาทำการทดสอบด้วยวิธี ABTS จะเกิดการฟอกจางสีจากสีน้ำเงินของสารละลาย ABTS** radical จางลง และสามารถตรวจสอบปริมาณโดยการใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรีได้

1.3.3 หากสารสกัดรากผักหวานป่ามีสารกลุ่มฟีนอลิกอยู่จริง เมื่อนำมาทำการทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay สีของสารละลายจะมีสีเหลืองเข้มจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารกลุ่มฟีนอลกับรีเอเจนต์ และสามารถตรวจสอบปริมาณโดยการใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรีได้

1.4 ขอบเขตการศึกษาของงานวิจัย

1.4.1 ขอบเขตด้านระยะเวลาการศึกษา

1) เริ่มต้นศึกษา เมื่อวันที่ 15 เดือน พฤษภาคม 2562

2) สิ้นสุดการศึกษา เมื่อวันที่ 23 เดือน ธันวาคม 2562

1.4.2 ขอบเขตด้านเนื้อหา

1) ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัยคือ ผักหวานป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Melientha suavis Pierre.

ชื่อวงศ์ : Opiliaceae

2) ศึกษาฤทธิ์การด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

3) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

4) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

1.4.3 ขอบเขตด้านพื้นที่

1) เก็บตัวอย่างผักหวานป่าจากเขตพ้นที่อำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยา ประเทศไทย

2) ห้องปฏิบัติการเคมี SC1307 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของงานวิจัย

1) ทำให้ทราบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดรากผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85%เอทานอล

2) เพื่อส่งเสริมให้ผักหวานป่าเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

3) สามารถนำงานวิจัยนี้ไปเป็นแนวทางการพัฒนาสารสกัดผักหวานป่า เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ และใช้ส่งเสริมทางด้านสุขภาพได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผักหวานป่า

ผักหวานป่าเป็นพืชในวงศ์ Opiliaceae มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Melientha suavis Pierre* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศเอเชียอาคเนย์ ในประเทศไทยพบทั่วทุกภาค ในท้องที่ภาคเหนือที่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง ตาก ภาคอิสานที่จังหวัดอุดรธานี นครพนม สกลนคร นครราชสีมา ภาคกลางที่จังหวัดกาญจนบุรี สระบุรี ภาคใต้ที่จังหวัด สุราษฎร์ธานี กระบี่ (สงบ, 2554)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง มีลำดับต้นสูงประมาณ 5-10 เมตร หรือโตเต็มที่อาจสูงได้มากถึง 15 เมตร แต่ที่พบทั่วไปในแปลงปลูกจะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก เพราะมีการตัดยอด และตัดแต่งกิ่ง โดยลำต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง ลำต้นแตกกิ่งมาก เปลือกลำต้นมีสีน้ำตาลอมเทา ผิวลำต้นขรุขระ

ใบ เป็นใบเดี่ยว (simple leaf) ออกเรียงสลับกัน ใบอ่อนรูปร่าง แคบรี ปลายใบแหลม สีเขียวอมเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มเมื่ออายุ มากขึ้น ใบแก่เต็มที่รูปรีกว้างถึงรูปไข่หรือไข่กลับ สีเขียวเข้ม เนื้อใบกรอบ ขอบใบเรียบ ปลายใบมน หรือเว้าบุ๋มมีติ่งหนาม บางครั้งพบปลายใบแหลม ฐานใบสอบเรียว ขนาดใบกว้าง 2.5-5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 6-12 เซนติเมตร ก้านใบสั้น ขนาดยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร

ดอก ผักหวานป่ามีการออกดอกแยกต้น (dioecious) เป็นต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ลักษณะช่อดอกเป็นแบบช่อแยกแขนง (panicle) คล้ายช่อดอกมะม่วงหรือลำไย ยาวประมาณ 7-12 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม มีประมาณ 3-5 ดอก ดอกเพศเมียออกเป็นช่อดอกจำนวนมากรวมเป็นกระจุกตามลำต้นและกิ่ง ดอกเพศผู้เป็นช่อเดี่ยว หรือมี 2-3 ช่อในกระจุกเดียวกัน เกิดตามปลายกิ่งปะปนกับยอดอ่อนที่แตกใหม่มาพร้อมๆ กันช่อดอกใช้เป็นอาหาร เกษตรกรสามารถเก็บขายได้ในราคาเดียวกับยอดอ่อน ผักหวานป่าออกดอกประมาณเดือนธันวาคม-มีนาคม

ผล ผักหวานป่าออกผลเป็นช่อตามลำต้นเหมือนผลของมะไฟหรือลางสาด เป็นผลเดี่ยว (Simple fruit) แบบ Drup ภายในมีเมล็ดเดียว ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถึงเหลืองอมส้ม ผลมีขนาดประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร ผลแก่ประมาณเดือนเมษายน-พฤษภาคม (ณัฏฐากรและบัณฑิต, 2554)

2.1.2 การใช้ประโยชน์

ในหลายจังหวัดในภาคเหนือ นิยมนำส่วนต่าง ๆ ของผักหวานป่ามาประกอบอาหาร ยอดอ่อนของผักหวานป่ามีรสหวานมัน นำประกอบอาหารในหลายอย่าง เช่น แกงผักหวานป่า แกงเลียง แกงจืด ผัด นึ่ง เป็นต้น ดอกและผลอ่อนของผักหวานป่ามีรสหวานมันเช่นเดียวกับยอดอ่อน จึงเป็นที่นิยมนำมาทำทำเป็นแกงหรือนึ่ง กินกับน้ำพริก เป็นต้น

ผักหวานป่าเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถใช้ส่วนต่างๆ มาทำยาหรือประกอบเป็นยารักษาโรคที่มีสรรพคุณในด้านต่าง ๆ เช่น ใบและราก ใช้รักษาแผล ปวดในข้อ ปวดหัว ปวดท้อง ราก ใช้เป็นยาเย็นถอนพิษ แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้พิษไข้ น้ำดีพิการ ยาง ใช้กวาดคอเด็ก แก้ลิ้นเป็นฝ้าขาว

(ก) (ข)

รูปที่ 1 ลักษณะต้นผักหวานป่า (ก) และดอกผักหวานป่า (ข)

2.2 การเตรียมพืช

การเตรียมพืช ประกอบด้วยการคัดเลือก ศึกษาข้อมูล การเก็บตัวอย่างพืช การเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืช และการเตรียมตัวอย่างพืชให้มีขนาดที่เล็กลงเพื่อสามารถใช้ในการศึกษาวิจัย

2.2.1 การคัดเลือกพืช

1. คัดเลือกพืชที่เป็นพืชกลุ่มสมุนไพร ซึ่งสามารถหาและรับประทานได้ง่ายตามท้องถิ่น และยังสามารถใช้เป็นยาสมุนไพรซึ่งใช้เป็นยาแผนโบราณได้

2. คัดเลือกพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันหรือในวงศ์ที่ใกล้เคียงกันกับพืชที่มีการศึกษาว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.2.2 การเก็บพืช

1. พืชที่จะนำมาสกัดนั้น ต้องมีการศึกษาเอกลักษณ์ของพืชให้ถูกต้อง เนื่องจากมีพืชหลากหลายชนิดมีความคล้ายคลึงกัน

2. การเลือกเก็บพืชที่สมบูรณ์ เก็บตามฤดูกาลของพืช เพื่อผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ

3. เก็บพืชในตัวอย่างที่มีปริมาณมากพอ เพื่อเป็นพืชตัวอย่าง (Original sample)

4. การจดบันทึกในส่วนที่เกี่ยวข้อง วัน เวลา ที่เก็บพืช ปริมาณของพืช เป็นต้น

5. ต้องนำตัวอย่างมาทำให้แห้ง และต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ และป้องกันการเสื่อมคุณภาพของพืชได้

2.2.3 การเตรียมพืชก่อนการสกัด

1. การเตรียมพืชแบบแห้ง คือ การนำพืชสดนั้น นำมาทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วละใช้อุณหภูมิที่ต่ำ เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของพืช เนื่องจากการทำให้พืชแห้งโดยใช้อุณหภูมิสูงนั้นอาจจะทำให้สารที่สำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงไป

2. ในการทำให้พืชแห้งนั้น โดยทั่วไป ใบ และดอกของพืชนั้น จะทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการอบอย่างต่ำ 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้นออกจากพืช

3. พืชที่แห้งควรเก็บไว้ในที่แห้ง หรือถุงซิปล็อค เพื่อป้องกันความชื้นที่จะเกิดขึ้นภายในตัวพืช และควรหลีกเลี่ยงการเก็บพืชทิ้งไว้เป็นเวลานาน

2.3 การสกัดสารสำคัญออกจากพืช

การสกัดสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างพืชมีหลายวิธี แต่ละวิธีก็จะมีวิธีสกัดที่แตกต่างออกกันไป และมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป

1. การหมัก (Maceration)

เป็นวิธีการสกัดโดยนำสมุนไพรหมักกับตัวทำละลาย ในภาชนะที่ปิด ทิ้งไว้ 3-7 วัน เขย่าหรือคนบ่อยๆ แล้วกรองเอาสารสกัดไปใช้ ถ้าต้องการนำสารออกจากพืชอาจต้องสกัดหลายครั้ง

ข้อดี คือสารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก และมักไม่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเนื่องจากจะทำให้บูด

2. การสกัด (Soxhlet Extraction)

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ ใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดก้นกลมระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมา จนถึงจุดหนึ่งก็จะไหลกลับลงไปในขวดก้นกลมใหม่โดยใช้วิธีกาลักน้ำ แล้วกลั่นตัวขึ้นไปใหม่จนสกัดได้หมด

2.4 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุล ที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ (Unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัว โคจรรอบวงนอกสุด อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบ ๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอน จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่พบได้ทั่วไปแสดงดังตารางที่ 1 (Cornelli, 2009)

2.4.1 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ

แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ปัจจัยภายในร่างกาย โดยที่ร่างกายเผาผลาญน้ำตาลเพื่อใช้เป็นพลังงานในร่างกาย การปล่อยเอนไซม์มาเพื่อย่อยอาหารหรือการออกกำลังกาย และอีกปัจจัยเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น การสัมผัสรังสีต่าง ๆ เช่น รังสียูวี รังสีเอกซเรย์ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าพลังงานสูง การสูดดมควันบุหรี่ มลพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น โลหะหนัก การรับประทานอาหารที่ปิ้งหรืออย่างจนไหม้เกรียม สารเคมีจากอุตสาหกรรมก๊าซโอโซนที่ถูกนำมาใช้ทางอุตสาหกรรมและเครื่องใช้ในบ้าน ยารักษาโรคบางชนิด ย่าฆ่าแมลง ฯลฯ

2.4.2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

Reactive oxygen species			
Free radicals	**Formula**	**Non-radicals**	**Formula**
Oxygen radical	$O^{\bullet}_2$	Singlet oxygen	$^1O_2^{\bullet}$
Superoxide radical	$O_2^{\bullet -}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hydroxyl radical	$OH^{\bullet}$	Ozone	O_3
Hydroperoxyl radical	$HO_2^{\cdot}$	Organic peroxide	ROOH
Peroxyl radical	$RO_2^{\cdot}$		

Alkoxyl radical	$RO^{\cdot}$		
Carbonate radical	$CO_3^{\cdot-}$		
Reactive chlorine species			
Chlorine radical	$Cl^{\bullet}$	Hypochloric acid	HOCl
		Nitryl chloride	NO_2Cl
		Chlorine gas	Cl_2
Reactive nitrogen species			
Nitric oxide radical	$NO^{\bullet}$	Nitric oxide	HNO_2
Nitrogen dioxide radical	$NO_2^{\bullet}$	Peroxynitrite	ONOO
		Peroxynitrous acid	ONOOH
		Nitryl chloride	NOOCl

2.4.3 อนุมูลอิสระและการเกิดโรค

อนุมูลอิสระ มีผลต่อการเสื่อมสภาพของเซลล์และการเกิดโรคเรื้อรัง ต่าง ๆ นอกจากนั้นยังพบความสัมพันธ์ ระหว่างการมีอายุยืนกับระดับของสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อเช่น วิตามินอี คาโรทีนอยด์ กรดยูริค

2.4.4 การป้องกันอนุมูลอิสระ

การลดปริมาณอนุมูลอิสระเพื่อไม่ให้ร่างกายมีมากเกินไป สามารถทำได้หลายอย่าง เช่น การหลีกเลี่ยงการเผชิญแสงแดด ตลอดจนสิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ฝุ่น ควัน สารเคมี ยาฆ่าแมลง ไม่สูบบุหรี่และดมควันบุหรี่จากผู้อื่น เลี่ยงอาหารที่ปรุงโดยการปิ้ง ย่าง หรือเผาจนไหม้เกรียม เลือกรับประทานอาหารที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชันกระบวนการออกซิเดชันมีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิท ทำให้แอปเปิ้ลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของเราซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชัน ในอีกทางหนึ่ง กระบวนการออกซิเดชันเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น เราใช้ออกซิเจนจากอากาศที่หายใจเข้าไปเผาผลาญอาหารที่ร่างกายได้รับให้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ แต่ก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ อนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีนดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลดังกล่าว ตัวอย่างเช่น เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับแอลดีแอล (LDL : Low-density lipoprotein) ซึ่งเป็นคอเลสเตอรอลตัวเลวทำให้เกิดออกซิไดซ์แอลดีแอล (oxidized LDL) ซึ่งมีหลักฐานยืนยันว่า ออกซิไดซ์แอลดีแอลเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจ

2.5.1 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคหลายโรคโดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (เช่น อัลไซเมอร์) เป็นต้น รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่โดยปกติร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะทำอันตราย แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็วหรือมากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ สารต้านอนุมูลอิสระลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทาง คือ

1. ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย
2. ลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

ถึงแม้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถแก้ไขความเสียหายที่เกิดขึ้นแล้ว แต่สามารถชะลอให้ความเสียหาย เกิดช้าลงได้โดยเฉพาะโรคเรื้อรังซึ่งเป็นผลลัพธ์สะสมที่เกิดจากเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกายถูกทำอันตรายและเสียหายเป็นปี ๆ (โดยมากเป็นเวลาหลายสิบปี) เห็นได้จากการรวบรวมความชุดของโรคว่าโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เป็นมากในผู้ใหญ่วัยกลางคนหรือผู้สูงอายุ ดังนั้นบุคคลทุกเพศทุกวัยจึง

ควรได้รับสารด้านอนุมูลอิสระให้พอเพียงต่อความต้องการในแต่ละวัน เพื่อให้เกิดความสมดุลในร่างกาย ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

2.5.2 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งได้ 2 ชนิด ได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารประกอบฟรนอลิก (phenolic) สังเคราะห์ 5 ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydrxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butythydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนแปลง สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติทั่วไป แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokomy, 2001)

ตารางที่ 2 สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Antioxidant compound	Perceived health benefit
β-Carotene, lutein	Antimutagenic Protective against breast cancer
Bromophenol	α-Glucosidase inhibition
Carraggeenan, oligosaccharide	Anti-tumor
Fucoidan	Anti-HIV Ameliorales hyperoxaluria
	Anticancer Protection against
	Neurodegenerative disorder
Fucophlorethols	Chemoperventive effects
Fucoxanthin	Antiangiogenic Protective effects against
	Retinol deficiency
Galactan sulfate	Anti-viral

Phlorotannins	Anti-inflammatory Bactericide lnhibits H_2O_2 mediated DNA damage Hypertension Photochemopreventive effects
Polyphenols	Vascular chemoprotection Antiproliferation Antimicrobial α-Glucosidase inhibition
Phycoerythrin	Amelioraton of diabetic complications
Porphyran, shinorine	Delays aging process

2. สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ตารางที่ 3 สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ

ชนิดของพืช	**ชนิดของสารต้านออกซิเดชัน**
ชาเขียว	อีพิแกลโลแคทีชินแกลเลต อีพิแกลโลแคทีชิน และอิพิแคทีชินแกลแลต
กานพลู ข่า ตะไคร้	ยูจีนอล
วานิลลา	วานิลลิน
ขิง	จินเจอรอล (gingerol)
พริก	แคปไซซิน (capsaicin)
งา	เซซามอล เซซามอลไดเมอร์ เซซาโมลินอล และ เซซามินนอล
ถั่วเหลือง	เจเนสทีน ไอโซฟลาโวน (isoflavone)
ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง สีแดง หรือสีเข้ม	แคโรทีนอยด์

บางชนิด	
ชา	เอสเทอร์ของกรดแกลลิกา
ผักและผลไม้ที่มีสีม่วงและสีแดงบางชนิด เช่น องุ่น มะเขือม่วง ลูกหว้า หนามแดง	แอนโทไซยานิน
ชา	เอสเทอร์ของกรดแกลลิกา
ผลไม้	วิตามินซี

2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.6.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

DPPH assay หรือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้รีเอเจนต์คือ 2,2-phenyl-1-picrylhydrazyl เป็นแรดิคัลที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และน้ำ สารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (Brand-Williams และ Cuvelier, 1995)

วิธี DPPH ทำได้โดยเตรียมสารละลาย DPPH (ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยละลายในเมทานอล) ผสมกับสารตัวอย่างหลังตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล ช่วงความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลือ 50% เพื่อหาค่า IC_{50} โดยคำนวณ % inhibiton DPPH ตามสมการดังนี้

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

ข้อดีของวิธี DPPH คือ เป็นวิธีที่ง่าย และเป็นวิธีพื้นฐานในการวิเคราะห์ที่ให้ความถูกต้องและรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์ร่างกาย

2.6.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

$ABTS^{\bullet+}$ radical cation decolorization assay ใช้เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสาร

สังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน วิธีการเตรียมทำได้โดยการละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ammonium ในน้ำและเติม Potassium sulfate ตั้งสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงจนได้สารละลายซึ่งมีสีน้ำเงิน-เขียว จากนั้นทำการเจือจางด้วยเอทานอล จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660, 734 และสูงสุด 820 นาโนเมตร แต่จะนิยมใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสง ณ จุดเวลาต่าง ๆ การทำปฏิกิริยาระหว่าง $ABTS^{\bullet+}$ ลดลง หรือสีจางลง (Re, et. al., 1999)

$$ABTS^{\bullet+} + AH \text{ (antioxidant)} \longrightarrow ABTS \text{ (สีจางลง)} + A^{+}$$

เมื่อตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับมาตรฐานโทรลอกซ์ทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH

ข้อดีของวิธีการนี้คือ ABTS ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง

ข้อเสียคือ ABTS ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

เป็นการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay วิธีนี้อาศัยหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu ซึ่งจะประกอบไปด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent สารดังกล่าวนั้นจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups จะเกิดเป็นสารประกอบ Tungsten และ Molybdenum blue ซึ่งจะให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน (Skerget, et. al., 2005)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องกลั่นสาร
2. เครื่องกวนสารละลาย
3. ตู้อบลมร้อน
4. เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์
5. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ปีกเกอร์ ขนาด 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
3. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 2,000 มิลลิลิตร
5. ขวดก้นกลม ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

6. ไมโครปิเปต ขนาด 10-100, 100-1,000 และ 1,000 – 10,000 ไมโครลิตร
7. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 5, 10, 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร
8. ไมโครปิเปตทิป ขนาด 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครลิตร
9. เซลล์บรรจุตัวอย่าง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
10. หลอดหยด
11. กรวยกรอง
12. แท่งแก้วคนสาร
13. อลูมิเนียมฟอยส์
14. พาราฟิล์ม
15. ขวดสีชา
16. ช้อนตักสาร

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Methanol, CH_3OH (AR grade, Merck KGaA, Germany)
2. Ethanol, CH_3CH_2OH (AR grade, Merck KGaA, Germany)
3. L-Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$ (AR grade, Chem-supply Pty Ltd, Australis)
4. DPPH (2,2-diphynyl-1-picrylhydrazyl, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) Sigma-Aldrich, USA
5. Folin-Ciocalteu reagent (AR grade, Sigma-Aldrich, Germany)
6. Gallic acid, $C_7H_6O_5$ (ACS reagent, Sigma-Aldrich, Spain)
7. Hexane, C_6H_{14}
8. Potassium sulfate, $K_2S_2O_8$ (AR, Ajax, Australia)
9. ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) AR, grade, Sigma-Aldrich, America
10. Ethyl acelate, $C_4H_2O_2$
11. Trolox, $C_{14}H_{18}O_4$ (AR grade, Sigma-Aldrich, America)
12. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, H_2O)

3.2 วัตถุดิบ

สถานที่เก็บตัวอย่าง อำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยา เก็บตัวอย่างเดือนเมษายน 2562

3.3 การเตรียมตัวอย่างผักหวานป่า

นำรากผักหวานป่ามาสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด

3.4 การสกัดผักหวานป่า

นำผักหวานที่บดละเอียด 400 กรัม นำมาสกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลาย 85% เอทานอลที่ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ปิดสนิทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง กรองเอาสารละลายผ่านกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Evaporator) ส่วนที่เหลือคือสารสกัดหยาบครั้งที่ 1 นำกากที่เหลือจากการกรองไปสกัดซ้ำตามขั้นตอนเดิมอีก 2 ครั้ง นำส่วนสกัดหยาบทั้งสามครั้งมารวมกันได้สารสกัดหยาบของรากผักหวานป่า

3.5 การเตรียมสารละลาย (Stock Solution) ที่ใช้ในการทดสอบ DPPH

3.5.1 การเตรียมสารละลาย DPPH• radical

การเตรียมสารละลาย DPPH• radical ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยทำการชั่งสาร DPPH• radical 0.0039 กรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

3.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Stock Solution) โดยทำการชั่งสารแอสคอร์บิก จำนวน 0.0100 กรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ให้มีความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 และ 640 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่เตรียมไว้ (Stock Solution) มา 0.0125, 0.0250, 0.0500, 0.1000, 0.2000, 0.4000, 0.8000, 1.6000 และ 3.2000 มิลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรด้วยเมทานอล

3.5.3 การเตรียมสารละลายจากส่วนสกัดหยาบ

เตรียมสารละลายจากส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่า ให้มีความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Stock Solution) โดยทำการชั่งสารสกัดรากผักหวานป่า 0.0750 กรัม นำมาละลายด้วย เมทานอลและ

ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดวัดประมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดรากผักหวานป่า ให้มีความเข้มข้น 20, 40, 80, 160, 1,000, 2,000 และ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่าที่เตรียมไว้ (Stock Solution) มา 0.0333, 0.0667, 0.1333, 0.2667, 0.5333, 1.0677, 1.6667, 3.3333 และ 5.0000 มิลลิลิตร และทำการปรับปรุงปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรด้วยเมทานอล

3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

3.6.1 วิธีการหาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{MAX}) ของวิธี DPPH

1. เปิดเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการอุ่นเครื่องก่อนการใช้งาน

2. ปิเปตสารละลายเมทานอลลงในคิวเวต ลงในช่องบรรจุเซลล์สาระลายทั้งสองเซลล์ เพื่อทำ Baseline correction

3. ปิเปตสารละลายดีพีพีเอช ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติมเมทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที

4. นำเซลล์บรรจุสารละลายด้านนอกออกและนำสารละลาย (ข้อ 3) ลงในคิวเวตแล้วใส่ช่องบรรจุเซลล์

5. สแกนหาความยาวคลื่นที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตรร์ ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ย

3.6.2 วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (L-Ascorbic acid)

1. เตรียมสารละลายดีพีพีเอช ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยทำการชั่ง $DPPH^{\bullet}$ น้ำหนัก 0.0039 กรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

2. ชั่งสารแอสคอร์บิก น้ำหนัก 0.100 กรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่มีความเข้มขน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.0125, 0.0250, 0.0500, 0.1000, 0.2000, 0.4000, 0.8000, 1.6000 และ 3.2000 มิลลิเมตร

ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้น 2.50, 5.00, 10, 20, 40, 80, 160, 320 และ 640 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

4. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากันและตั้งในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็น 10 นาที

5. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็น Blank

6. การวิเคราะห์สารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น จะวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเว้นระยะเวลาห่างกัน 1 นาที

7. นำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล อิสระ DPPH$^{\bullet}$ และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก จากนั้นคำนวณหาค่าสมการเส้นตรง

8. บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัด แล้วนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณร้อยละการอับยั้ง IC_{50}

3.6.3 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบ รากผักหวานป่า

1. ปิเปตส่วนสกัดหยาบกิ่งผักหวานป่าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.5.3 ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากันและตั้งในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

2. บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัด แล้วนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณร้อยละการยับยั้ง IC_{50}

3. ข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดผักหวานป่า จากนั้นคำนวณหาค่าสมการเส้นตรง

4. เปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดผักหวานป่าและสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

3.7 การเตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

3.7.1 การเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ reagent

1. เตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยทำการชั่งสาร ABTS น้ำหนัก 0.0392 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 2.45 มิลลิโม-ลาร์ โดยทำการชั่งสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต น้ำหนัก 0.170 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

3. นำสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ จากข้อ 1 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา ปิดปากขวดให้สนิทและพันด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยส์หุ้มไว้ ให้สารทั้งสองทำปฏิกิริยากัน ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สารละลายสีเข้มข้นที่มี $ABTS^{\bullet+}$ radical cations ก่อนการวิเคราะห์ทุกครั้งจะนำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ radical cations ไปทำการเจือจางด้วยเอทานอล เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7±0.02 โดยจะปิเปตสารละลายจำนวน 2 มิลลิลิตร และนำมาปรับด้วยเอทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.7.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ ให้มีความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการชั่งสารโทรลอกซ์ น้ำหนัก 1.5 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยเอทานอล และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ที่เตรียมไว้ มา 0.00, 0.8333, 1.6667, 2.50, 3.0000, 4.1667 และ 5.00 มิลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรด้วยเอทานอล

3.7.3 การเตรียมสารละลายสารสกัดรากผักหวานป่า

เตรียมสารละลายสารสกัดรากผักหวานป่า ให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิลิตร โดยทำการชั่งสารสกัดหยาบกิ่งผักหวานป่า น้ำหนัก 5 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยเอทานอล คนสารละลายอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องกวนสารละลาย และ ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร

3.7.4 วิธีการหาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{MAX}) ของวิธี ABTS

1. เปิดเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการอุ่นเครื่องก่อนการใช้งาน

2. ปิเปตสารละลายเอทานอลลงในคิวเวต ลงในช่องบรรจุเซลล์สารระลายทั้งสองเซลล์ เพื่อทำ Baseline correction

3. ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีที่เตรียมในข้อ 3.7.1 ปริมาตร 2.70 มิลลิลิตร หลังจากเติมเอทานอล ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมและเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิเป็นเวลา 5 นาที

4. นำเซลล์บรรจุสารละลายด้านนอกออกและนำสารละลาย ในข้อ 3 ลงใน คิวเวต แล้วใส่ช่องบรรจุเซลล์

5. สแกนหาความยาวคลื่นที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ย

3.7.5 วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

1. เตรียมสารละลาย จาก (ข้อ 3.7.1) ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ จำนวน 2 มิลลิลิตร ละลายด้วยเอทานอล และปรับปริมาตรด้วยเอทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ไม่ให้โดยแสงโดยใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอยส์หุ้มไว้

2. ชั่งสารโทรลอกซ์ จำนวน 1.5 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยเอทานอล และปรับปริมาตรด้วยเอทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่มีความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่มีความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.00, 0.8333, 1.6667, 2.50, 3.333, 4.1667 และ 5.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จะได้สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตตามลำดับ

4. ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายดีพีพีเอช ปริมาตร 2.70 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากันและตั้งในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที

5. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี- วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เอทานอลเป็น Blank

6. การวิเคราะห์สารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น จะวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเว้นระยะเวลาห่างกัน 1 นาที

7. คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition $ABTS^{\bullet+}$) ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์

8. นำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเอบีทีเอส และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ จากนั้นคำนวณหาค่าสมการเส้นตรง

3.7.6 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า

1. เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบรากผักหวานป่าที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.7.3

2. ปิเปตสารละลายของสารสกัดหยาบกิ่งผักหวานป่า ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาตร 2.70 มิลลิลิตร

3. เขย่าให้เข้ากันและตั้งในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที

4. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เอทานอลเป็น Blank

5. การวิเคราะห์สารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น จะวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเว้นระยะห่างกัน 1 นาที

6. คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% lnhibition $ABTS^{\bullet+}$) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 85% สารมาตรฐานโทรลอกซ์และสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

7. เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของโทลอกซ์ แสดงค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ที่มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ ปริมาณของสารละลายมาตรฐาน โทรลอกซ์ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ 1 หน่วยของน้ำหนักตัวอย่าง

3.8 การเตรียมสารละลายที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

3.8.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการชั่งสารกรดแกลลิก น้ำหนัก 0.0102 กรัม ละลายด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่เตรียมไว้มา 0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรด้วยเมทานอล

3.8.2 การเตรียมสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า

เตรียมสารละลายของส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่าให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิเมตร โดยทำการชั่งสารสกัดรากผักหวานป่า จำนวน 0.0050 กรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล คนสารละลายอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องกวนสารละลายและปรับปริมาตรด้วย เมทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร

3.8.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (w/v)

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตให้มีความเข้มข้น 7.5% (w/v) โดยทำการชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต น้ำหนัก 1.8788 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน คนสารละลายอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องกวนสารละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

3.8.4 การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v)

เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ให้มีความเข้มข้น 10% (v/v) ทำได้โดยการนำ Folin-Ciocaltelu reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

3.8.5 วิธีการหาค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{MAX}) ของวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

1. เปิดเครื่องยูวี – วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการอุ่นเครื่องก่อนการใช้งาน

2. ปิเปตสารละลายเมทานอลลงในคิวเวต ลงในช่องบรรจุเซลล์สารระลายทั้งสองเซลล์ เพื่อทำ Baseline correction

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที

4. นำเซลล์บรรจุสารละลายด้านนอกออกและนำสารละลาย (ข้อ 3) ลงในคิวเวตแล้วใส่ช่องบรรจุเซลล์

5. สแกนหาความยาวคลื่นที่ช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ย

3.8.6 วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, และ 100 มิลลิกรัม ต่อลิตร โดยปิเปตความเข้มข้น 0.20 มิลลิลิตร โดยแยกหลอดทดลองแต่ละหลอด

2. นำทุกหลอดจาก (ข้อ 1) เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่มีความเข้มข้น 10% (v/v) จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ที่มีความเข้มข้น 7.5% (w/v) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 50 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็น Blank

5. นำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก จากนั้นคำนวณหาค่าสมการเส้นตรง

3.8.7 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบผักหวานป่า

1. นำสารละลายสารสกัดหยาบกิ่งผักหวานป่าที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.7.2 ปริมาตร 0.20 มิลลิลิต ปิเปตลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่มีความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3. ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ที่มีความเข้มข้น 7.5% (w/v) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมและเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 50 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็น Blank

5. การวิเคราะห์สารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นจะวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเว้นระยะเวลาห่างกัน 1 นาที

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ทำในวันเดียวกัน

7. รายงานผลในรูปค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสกัดรากผักหวานป่า

นำรากผักหวานที่บดละเอียด 400 กรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ปิดสนิทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง กรองเอาสารละลายผ่านกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Evaporator) ส่วนที่เหลือคือสาร

สกัดหยาบครั้งที่ 1 นำกากที่เหลือจากการกรองไปสกัดซ้ำตามขั้นตอนเดิมอีก 2 ครั้ง นำส่วนสกัดหยาบทั้งสามครั้งมารวมกันได้สารสกัดหยาบรากผักหวานป่า 10.5 กรัม

4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์การต้านนอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ทำได้โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ทำปฏิกิริยาสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จึงนำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ในการทดลองครั้งนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การด้านอนุมูลอิสระ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า หลังทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ และค่าร้อยละการยับยั้งสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ แสดงดังตารางที่ **1** และ **2**

เมื่อนำค่าร้อยละการยับยั้งสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ (% inhibition) กับความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกไปพล๊อตกราฟจะได้กราฟดังภาพที่ **1** จากกราฟเมื่อที่ความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกตั้งแต่ 40 ppm ค่าการยับยั้งจะเริ่มคงที่คือมากกว่าร้อยละ 96 ดังนั้นจึงนำค่าความสัมพันธ์ในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 40 ppm มาพลอตกราฟ ดังรูปที่ **2** จากกราฟที่ได้เป็นเส้นตรงมีสมการ คือ y = 2.0419x +47.34 ดังนั้นค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่สามารถยับยั้งได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 1.30 ppm

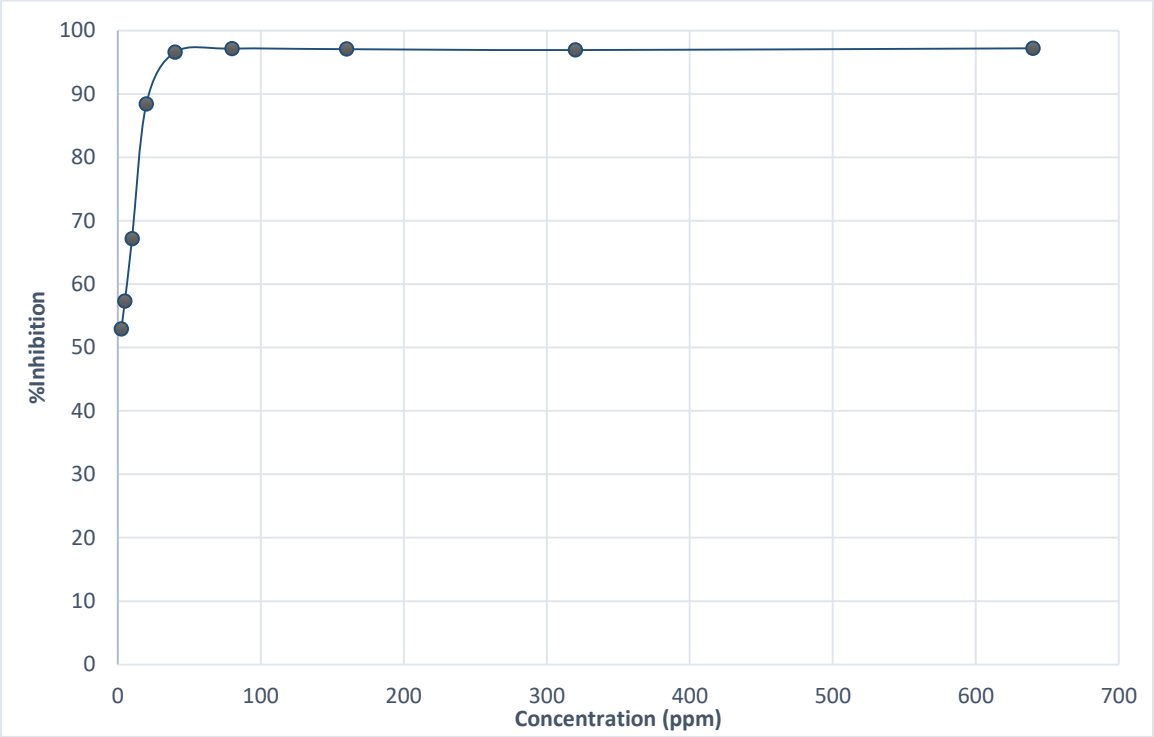
ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกรดแอสคอบิกทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH$^{\bullet}$

ความเข้มข้นของ	ค่าการดูดกลืนแสง				±SD	% Inhibition
กรดแอสคอบิก (ppm)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		DPPH$^{\bullet}$
2.5	1.09	0.996	1.00	1.023	0.0531	52.9655
5	0.93	0.942	0.943	0.928	0.0072	57.3333
10	0.705	0.723	0.714	0.714	0.0090	67.1724
20	0.262	0.232	0.259	0.251	0.0016	88.4598
40	0.077	0.069	0.076	0.074	0.0043	96.5977
80	0.061	0.055	0.068	0.061	0.0065	97.1954
160	0.063	0.059	0.066	0.063	0.0035	97.1034
320	0.065	0.07	0.065	0.066	0.0029	96.9655
640	0.06	0.056	0.065	0.06	0.0045	97.2414

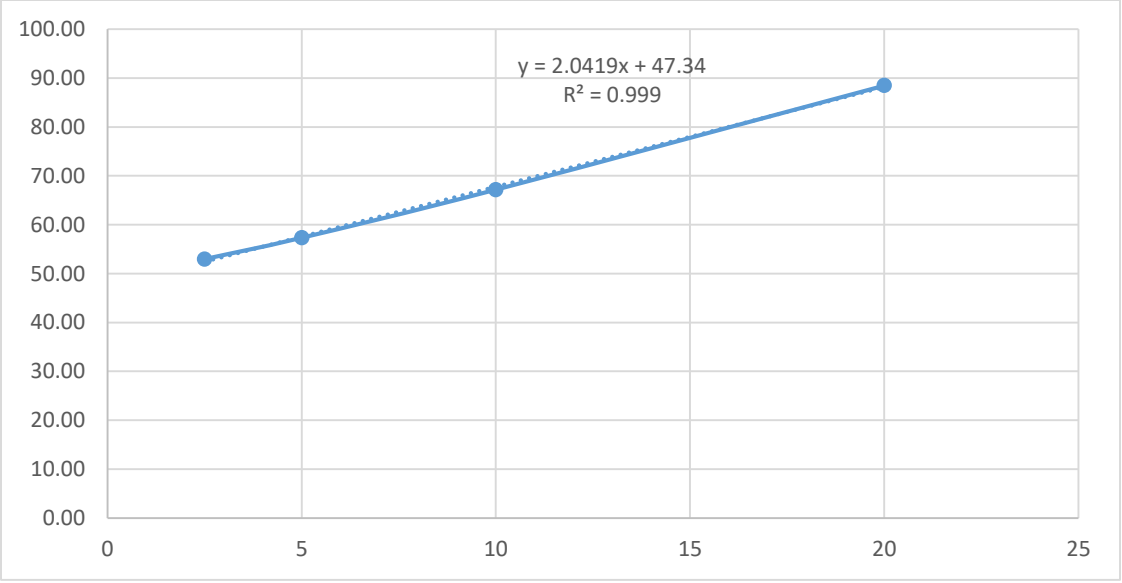
control 2.175 - - -

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากผักหวานป่าทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH•

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง				±SD	% Inhibition DPPH•
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
20	1.192	1.186	1.245	1.208	0.0325	30.2330
40	1.196	1.199	1.213	1.203	0.0091	30.5219
80	1.161	1.187	1.217	1.188	0.0280	31.3499
160	1.162	1.176	1.206	1.181	0.0225	31.7543
320	1.139	1.155	1.185	1.160	0.0234	33.0060
840	1.102	1.112	1.121	1.112	0.0095	35.7789
1000	1.059	1.07	1.092	1.074	0.0168	37.9742
2000	0.953	0.947	0.975	0.958	0.0147	44.6370
3000	0.836	0.856	0.89	0.861	0.0273	50.2792
Control	1.666	1.735	1.792	1.731	0.063	

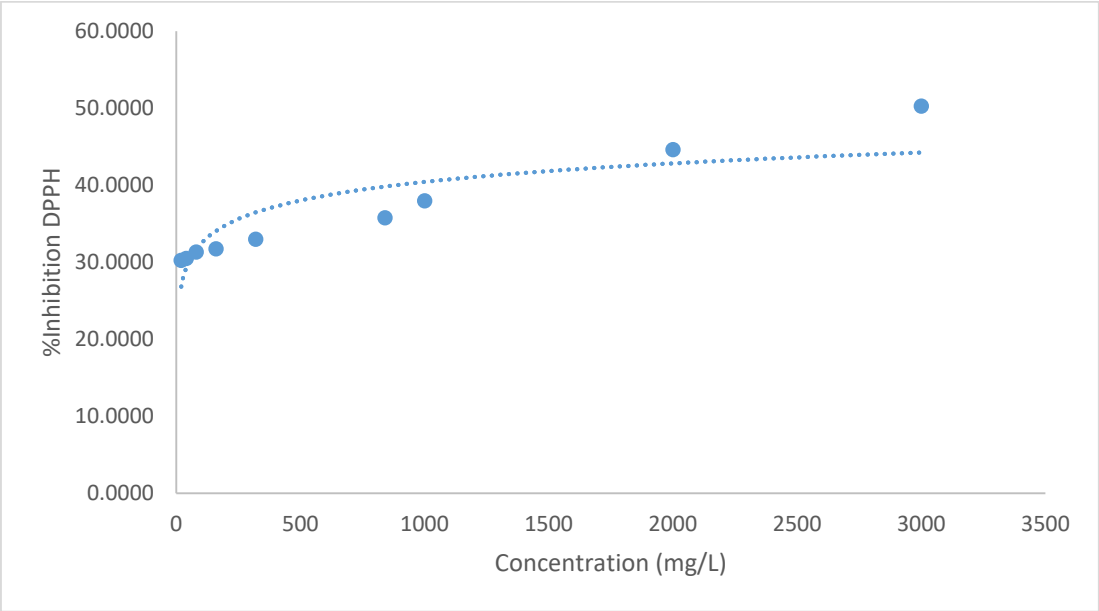


รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกกับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ DPPH●

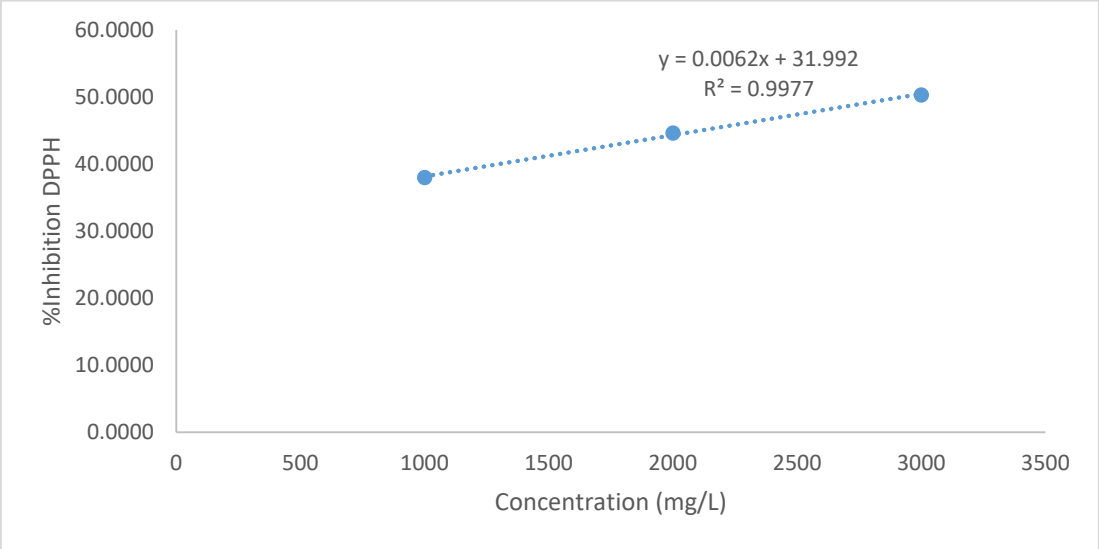


รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกกับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ DPPH● ในช่วงความเข้มข้นต่ำ

เมื่อนำค่าร้อยละการยับยั้งสารละลาย DPPH$^{\bullet}$ (% inhibition) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบรากผักหวานป่าไปพล๊อตกราฟจะได้กราฟดังภาพที่ **3** จากกราฟเมื่อที่ความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกตั้งแต่ 160 ppm ค่าการยั้บยั้งจะเริ่มคงที่คือมากกว่าร้อยละ 30 จึงนำค่าความสัมพันธ์ในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 160 ppm มาพลอตกราฟ ดังภาพที่ **4** จากกราฟที่ได้เป็นเส้นตรงมีสมการ คือ y = 0.0062x + 31.992 ดังนั้นค่าความเข้มข้นของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบรากผักหวานป่าที่สามารถยับยั้งได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 2904.51 ppm



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับร้อยละการยังยั้ง อนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายส่วนสกัดหยาบรากผักหวานป่ากับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ในช่วงความเข้มข้นต่ำ

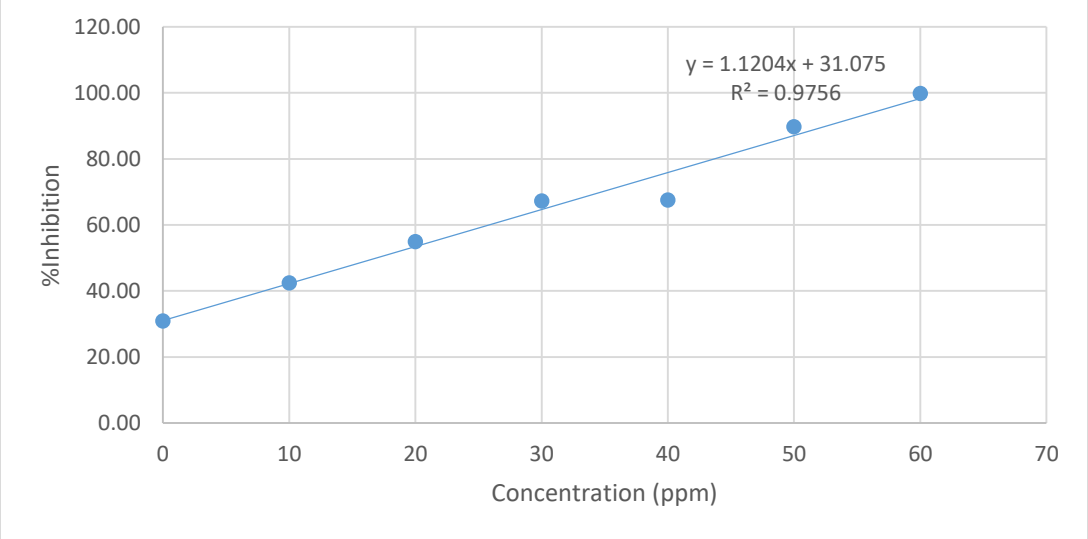
4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS ของสารสกัดรากผักหวานป่า ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม โดยใช้สารโทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐานและจะรายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดรากผักหวานป่าในรูปของ Trolox equivalent antioxidant capacity หรือ TEAC ผลการทดลองการยั้บยั้งอนุมูลอิสระของสารละลายโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3 เมื่อนำค่าความเข้มข้นกับร้อยละการยั้บยั้งสร้างกราฟจะได้กราฟเส้นตรง ที่มีสมการเส้นตรง $y = 1.1204x + 31.075$ และค่า $R^2 = 0.9756$

ผลการทดลองเมื่อใช้สารสกัดหยาบรากผักหวานป่าที่ความเข้มข้น 1000 ppm พบว่ามีร้อยละการยั้บยั้งเท่ากับ 14.71 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (**ตารางที่ 4**) ไปคำนวณเพื่อหาค่า TEAC พบว่า มีค่าเท่ากับ 1.036 mM เท่านั้น

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโทรลอกซ์ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS$^{\bullet+}$

ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง				% Inhibition
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	0.512	0.472	0.441	0.4750	39.7208
10	0.434	0.392	0.361	0.3957	49.7885
20	0.359	0.307	0.263	0.3097	60.7022
30	0.272	0.21	0.194	0.2253	71.4044
40	0.299	0.192	0.179	0.2233	71.6582
50	0.135	0.053	0.024	0.0707	91.0321
60	0.003	0	0	0.0010	99.8731
control	0.688				



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโทรลอกซ์กับร้อยละการยังยั้งอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโทรลอกซ์ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$

ความเข้มข้น mg/L	ค่าการดูดกลืนแสง				±SD	% Inhibition
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
1000	0.573	0.555	0.547	0.558	0.0133	14.7149
control	0.674	0.658	0.632	0.654	-	

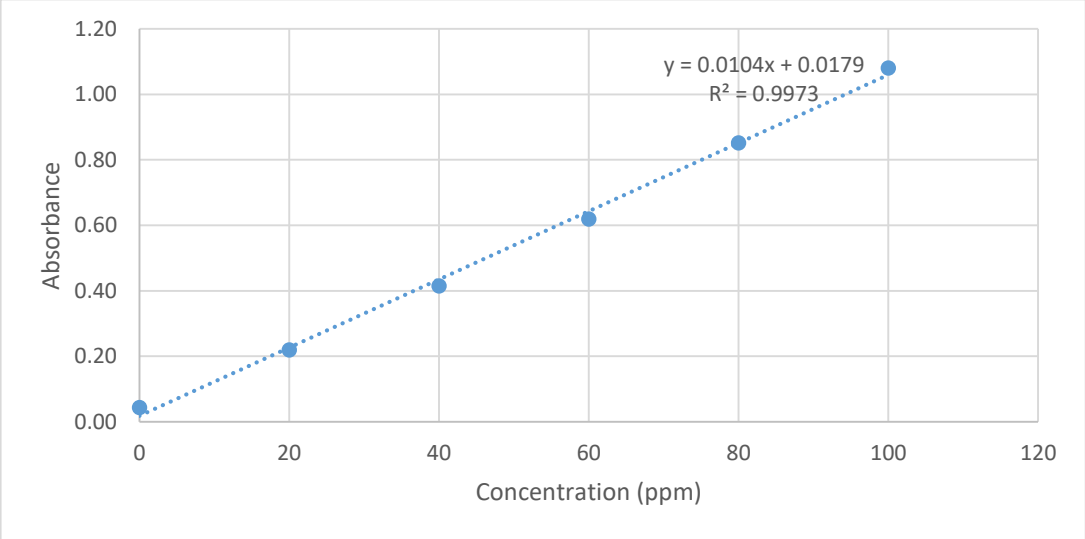
4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า โดยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงนำไปพล็อตกราฟเพื่อคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก และสารสกัดหยาบรากผักหวานป่าทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu แสดงดัง**ตาราง 5** และ **6** ตามลำดับ กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมแสดงดังภาพที่ **6**

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกหลังทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin – Ciocalteu กับค่าการดูดกลืนแสง จะได้สมการเส้นตรง $y = 0.0104x + 0.01779$ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9973 แสดงดังภาพ 6 เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า คือ 0.14 แทนในค่า y ในสมการเส้นตรงจะได้ค่า x ซึ่งเป็นปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 11.47 ppm เมื่อคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักของสารสกัดจะได้เท่ากับ 0.56 mg GAE/gW

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 751 nm ของสารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำปฏิกิริยากับ Folin – Ciocalteu reagent

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง				±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	0.038	0.06	0.033	0.044	
20	0.288	0.257	0.114	0.220	
40	0.435	0.422	0.389	0.415	
60	0.607	0.631	0.622	0.620	
80	0.798	0.941	0.818	0.852	
100	1.113	1.063	1.068	1.081	



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของกรดแกลลิกหลังทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 751 nm ของสารละลายสารสกัดหยาบรากผักหวานป่า

ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำปฏิกิริยากับ Folin – Ciocalteu reagent

ความเข้มข้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง					Total phenolic content (mg GAE/gW)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	±SD	
1000	0.12	0.11	0.13	0.14	0.036	0.56

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินการวิจัย

5.1 สรุปผลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวม

จากการนำสารสกัดรากผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85% เอทานอล นำมาวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอสิกรวม พบว่า การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH แสดงผลค่า IC_{50} ดังนี้ สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 1.30 ppm สารสกัดรากผักหวานป่าเท่ากับ 2904.57 ppm โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อยจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากผักหวานป่าเกือบสามพันเท่า

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS แสดงผลค่า TEAC ซึ่งคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ดังนี้ สารสกัดผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85%เอทานอลเข้มข้น เท่ากับ 1.036 มิลลิโมลาร์ โดยพิจารณาจากค่า TEAC ที่มีค่ามากจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงดังนั้นสารฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากผักหวานป่าที่ต่ำมาก

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin – Ciocalteu ซึ่งแสดงผลค่าปริมาณ ฟีนอลิกรวม (mg) ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85% เอทานนอล เท่ากับ 0.56 mg GAE/gW พิจารณาจากค่าปริมาณฟีนอลิกรวมที่มีค่าต่ำมาก สารสกัดรากผักหวานป่าจึงมีปริมาณฟีนอลิกรวมในปริมาณที่ต่ำ จึงส่งผลให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาวิธีการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลายวิธี เพื่อเป็นการยืนยันผลการวิจัย

5.2.2 ควรทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ หรือวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีที่มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

บรรณาณุกรม

ณัฏฐาการ เสมสันทัด และ บัณฑิต โพธิ์น้อย (2552). ผักหวานป่า. สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้. กรมป่าไม้.

สงบ เจริญสุข (2554). การปลูกผักหวานป่าจังหวัดสระบุรี. เอกสารทางวิชาการ. กรมส่งเสริมการเกษตร.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90(17), 7915–7922.

Brand-Williams N., Cuvelier M.E. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Academic Press Limited. 28, 25-30.

Cornelli U. (2009). Antioxidant Use in Nutraceuticals. Clinics in Dermatology. 27(2), 175-194.

Lo K.M., Cheung P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of Agrocybe aegerita var. alba. Food Chem. 80, 533-539.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (2001). Antioxidants in Food: Practical Applications. CRC Press, New York.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and RiceEvans C. (1999).Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radicals in Biology and Medicine. vol. 26, 1231-1237.

Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simonic M., Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chem. 89, 191-198.

ภาคผนวก

ตัวอย่างการคำนวณ

1. การคำนวณหาน้ำหนักสาร (g) จากหน่วยพีพีเอ็ม (Part per million)

จาก

หน่วย พีพีเอ็ม (ppm) เทียบเท่ากับ หน่วย มิลลิกรัม/ลิตร (mg/L)

ตัวอย่างการคำนวณ

เตรียมสารละลายจากสารสกัดรากผักหวานป่า ให้มีความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

แสดงว่า

เมทานอล 1,000 มิลลิลิตร มีสารสกัดรากผักหวานป่า 3,000 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 25 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดรากผักหวานป่า เท่ากับ

$$= \frac{(25\ ml)(3{,}000\ mg)}{1{,}000\ ml}$$

$$= \frac{75{,}000\ ml.mg}{1{,}000\ ml}$$

$$= 75\ mg$$

$$= 75 \times 10^{-3}\ g$$

$$= 0.075\ g$$

ดังนั้น

การเตรียมสารละลายจากสารสกัดรากผักหวานป่า ให้มีความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม จะต้องชั่งสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า 0.075 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วย เมทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. การคำนวณหาน้ำหนักสาร (g) จากหน่วยมิลลิโมลาร์ (mM)

จากสูตร

$$n = \frac{g}{Mw} = \frac{cv}{1000}$$

เมื่อ

n คือ จำนวนโมลของตัวละลาย

C คือ ความเข้มข้น หน่วย โมล/ลิตร

V คือ ปริมาตรของสารละลาย หน่วย มิลลิลิตร

Mw คือ มวลโมเลกุลของตัวทำละลาย หน่วย กรัม/โมล

g คือ มวลของสาร หน่วย กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

เตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร (มวลโมเลกุล เท่ากับ 514.62 กรัม/โมล)

วิธีทำ

$$g = \frac{(C)(V)(Mw)}{1{,}000}$$

$$= \frac{(7\times10^{-3}\text{mol})(10\text{ml})(514.62\text{ g/mol})}{1{,}000\text{ ml}}$$

$$= 0.0360\text{ g}$$

ดังนั้น

การเตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ จะต้องชั่งสาร ABTS มา 0.0360 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3. การเจือจางสารละลายจากสารละลายที่ได้เตรียมไว้

จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ

C_1 คือ ความเข้มข้นสารละลายก่อนเจือจาง

C_2 คือ ความเข้มข้นสารละลายหลังเจือจาง

V_1 คือ ปริมาตรสารละลายก่อนเจือจาง

V_2 คือ ปริมาตรสารละลายหลังเจือจาง

ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 300 พีพีเอ็ม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(3{,}000 \text{ ppm})(V1) = (300 \text{ ppm})(5 \text{ mL})$$

$$V1 = \frac{(300 \text{ ppm})(5 \text{ mL})}{(3{,}000 \text{ ppm})}$$

$$V1 = 0.5 \text{ mL}$$

ดังนั้น

การเจือจางสารละลายจากสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม ให้มีความเข้มข้น 300 พีพีเอ็ม จะต้องปิเปตสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

4. การคำนวณค่า %Inhibition

จากสูตร

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(\text{A control-A sample})}{\text{A control}} \times 100$$

เมื่อ

$A^{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย DPPH radical และตัวทำละลายที่ใช้

A^{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH radical

ตัวอย่างการคำนวณ

การคำนวณ % Inhibition ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็มจากค่าดูดกลืนแสง

เมื่อ $A_{control} = 2.175$

$A_{sample} = 0.705$

จากสูตร

$$\%\text{ Inhibition} = \frac{(\text{A control-A sample})}{\text{A control}} \times 100$$

$$= \frac{(2.175-0.705)}{2.175} \times 100$$

$$= 67.59 \text{ เปอร์เซ็น}$$

ดังนั้น

%Inhibition ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม เท่ากับ 67.59 เปอร์เซ็นต์

5. การคำนวณหาค่า IC_{50}, TEAC และปริมาณฟีนอลิกรวม

5.1 การคำนวณหาค่า IC_{50} (50% of inhibitory concentration)

1.1 การคำนวณของมาตรฐานวิตามินซี

จากสมการ y = 2.0419x + 47.34

แทน y = 50 ในสมการ

50 = 2.0419x + 47.34

$$x = \frac{(50-47.34)}{2.0419}$$

จะได้ค่า IC_{50} = 1.30 ppm

1.2 การคำนวณของสารสกัดรากผักหวานป่า

จากสมการ y = 0.0062x + 31.992

แทน y = 50 ในสมการ

50 = 0.0062x + 31.992

$$x = \frac{(50 - 31.992)}{0.0062}$$

จะได้ค่า IC_{50} = 2904.55 ppm

5.2 การคำนวณหา TEAC

2.1 การคำนวณของสารสกัดรากผักหวานป่า

ขั้นตอนที่ 1 คำนวณหาค่า %Inhibition

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1

เมื่อ $A_{control}$ = 0.674

A_{sample} = 0.573

$$\%Inhibition = \frac{(0.674 - 0.573)}{0.674} \times 100$$

= 14.98 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2

เมื่อ $A_{control} = 0.658$

$A_{sample} = 0.555$

$$\%Inhibition = \frac{(0.658-0.555)}{0.658} \times 100$$

$$= 15.65 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3

เมื่อ $A^{control} = 0.632$

$A^{sample} = 0.547$

$$\%Inhibition = \frac{(0.632 - 0.547)}{0.632} \times 100$$

$$= 13.45 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

ดังนั้น

ค่า %Inhibition เฉลี่ย เท่ากับ 14.69 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณหาน้ำหนักสารสกัด (มิลลิกรัม) จากปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.0050 มิลลิลิตร ของสารสกัดรากผักหวานป่า ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม

แสดงว่า

เอทานอล 1,000 มิลลิลิตร มีสารสกัดจากรากผักหวานป่า 1,000 มิลลิกรัม

ถ้า เอทานอล 0.0050 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า เท่ากับ

$$= \frac{(0.0050 \text{ mL})(1{,}000 \text{mg})}{1{,}000 \text{ mL}}$$

$$= 0.0050 \text{ mg}$$

ดังนั้น

ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.0050 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดรากผักหวานป่า เท่ากับ 0.0050 มิลลิกรัม

ขั้นตอนที่ 3 คำนวณหาค่า % Inhibition ต่อ น้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิกรัมของสาร สกัดรากผักหวานป่า

จาก ขั้นตอนที่ 1 %Inhibition เท่ากับ 14.69 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 สารสกัดรากผักหวานป่าเท่ากับ 0.0050 มิลลิกรัม

แสดงว่า

สารสกัดรากผักหวานป่าเท่ากับ 0.0050 มิลลิกรัม 0.0050 มิลลิลิตร

มี %Inhibition เท่ากับ 14.69 เปอร์เซ็นต์

ถ้า สารสกัดรากผักหวานป่า 1 มิลลิลิตร จะมี %Inhibition เท่ากับ

$$= \frac{(1\ mL) \times (14.69\ \%)}{0.0050\ mL}$$

$$= 2938\ \%$$

ดังนั้น

ค่า % Inhibition ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิลิตร ของสารสกัดรากผักหวานป่า เท่ากับ 2938 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 4 คำนวณหาค่า TEAC

จากกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

$$y = 1.1204x + 31.075$$

จากนั้น

นำค่า %Inhibition ต่อ น้ำหนักสารสกัด 1 มิลมิลิตรของสารสกัดรากผักหวานป่า แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นค่า TEAC ใน หน่วย ppm

จากสมการ $y = 1.1204x + 31.075$

แทนค่า y ด้วย 2938

$$2938 = 1.1204x + 31.075$$

$$y = \frac{(2938-31.075)}{1.1204}$$

= 2594.54 ppm

จากนั้น

นำค่า 2594.54 พีพีเอ็ม เปลี่ยนเป็นหน่วย มิลลิโมลาร์

เมื่อ

มวลโมเลกุลโทลอกซ์ = 250.290 กรัม/โมล

ขั้นตอนที่ 1 เปลี่ยนหน่วย พีพีเอ็ม หรือมิลลิกรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย กรัม/ลิตร

$$\frac{2594.54 \text{ mg/L}}{1{,}000} = 0.2594 \text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 2 เปลี่ยนหน่วย กรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย โมล

$$\frac{0.2594 \text{ g/L}}{250.29 \text{ g/mol}} = 1.036 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

หรือ 1.036×10^{-3} M

ดังนั้น ค่า TEAC ของสารสกัดรากผักหวานป่า เท่ากับ 1.036 มิลลิโมลาร์

5.3 การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม

การคำนวณของสารสกัดรากผักหวานป่า

จากขั้นตอนการทดลองหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดรากผักหวานป่า

ขั้นตอนการทดลอง การหาปริมาณฟีนอลิกรวม	ปริมาณ
น้ำหนักแห้งผักหวานป่า	0.40 กิโลกรัม
น้ำหนักสารสกัดเนื้อของผลผักหวานป่า	10.50 กรัม
น้ำหนักสารสกัดที่ใช้ทดสอบ	0.0050 กรัม
ปริมาตรในขวดปรับปริมาตร	25.0000 มิลลิลิตร
ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ	0.2000 มิลลิลิตร
ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	0.14

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม จะได้สมการเส้นตรง

$$y = 0.0104x + 0.0179$$

จากนั้น

นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารสกัดรากผักหวานป่าแทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย พีพีเอ็ม

จากสมการ $y = 0.0104x + 0.0179$

แทน $y = 0.14$ ในสมการ

$$0.14 = 0.0104x + 0.0179$$

$$x = \frac{(0.14 - 0.0179)}{0.0104}$$

$$= 11.47 \text{ ppm}$$

นำค่า 11.47 พีพีเอ็ม เทียบเป็นหน่วย มิลลิกรัม

แสดงว่า เมทานอล 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลิกรวม 11.47 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 0.2000 มิลลิลิตร จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(0.2000 \text{ mL})(11.47 \text{ mg})}{1,000}$$

$$= 0.023 \text{ mg}$$

ดังนั้น เมทานอล 0.2000 มิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.023 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 25 มิลลิลิตร จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(25 \text{ mL})(0.023 \text{ mg})}{0.2000 \text{ mL}}$$

$$= 2.87 \text{ mg}$$

แสดงว่า น้ำหนักสารสกัดที่ใช้ทดสอบ 0.0050 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.0028 กรัม

ถ้า น้ำหนักสารสกัดทั้งหมด 1 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(1 \text{ g})(0.0028 \text{ g})}{0.0050 \text{ g}}$$

= 0.56 g

ดังนั้น สารสกัดรากผักหวานป่า 1 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.56 mg GAE/g W

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล	นางสาวทักษพร พรมแก้วต่อ
วันเดือนปีที่เกิด	09/03/2541
ประวัติการศึกษา	ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนอุตรดิตถ์ดรุณี อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์ ปีที่จบ 2553 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอุตรดิตถ์ดรุณี อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์ ปีที่จบ 2558
ที่อยู่ปัจจุบัน	372/14 หมู่ที่ – ซอย 4 หมู่บ้าน- ถนนอินใจมี ตำบลท่าอิฐ อำเภอเมืองอุตรดิตถ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ 53000
เบอร์ติดต่อ	0865734988
อีเมล์	icy.33516@gmail.com