ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มแซนโทน โดยวิธีทางเคมีไฟฟ้า

โดย

เบญจมาส ไชยลาภ

สนับสนุนงบประมาณโดย

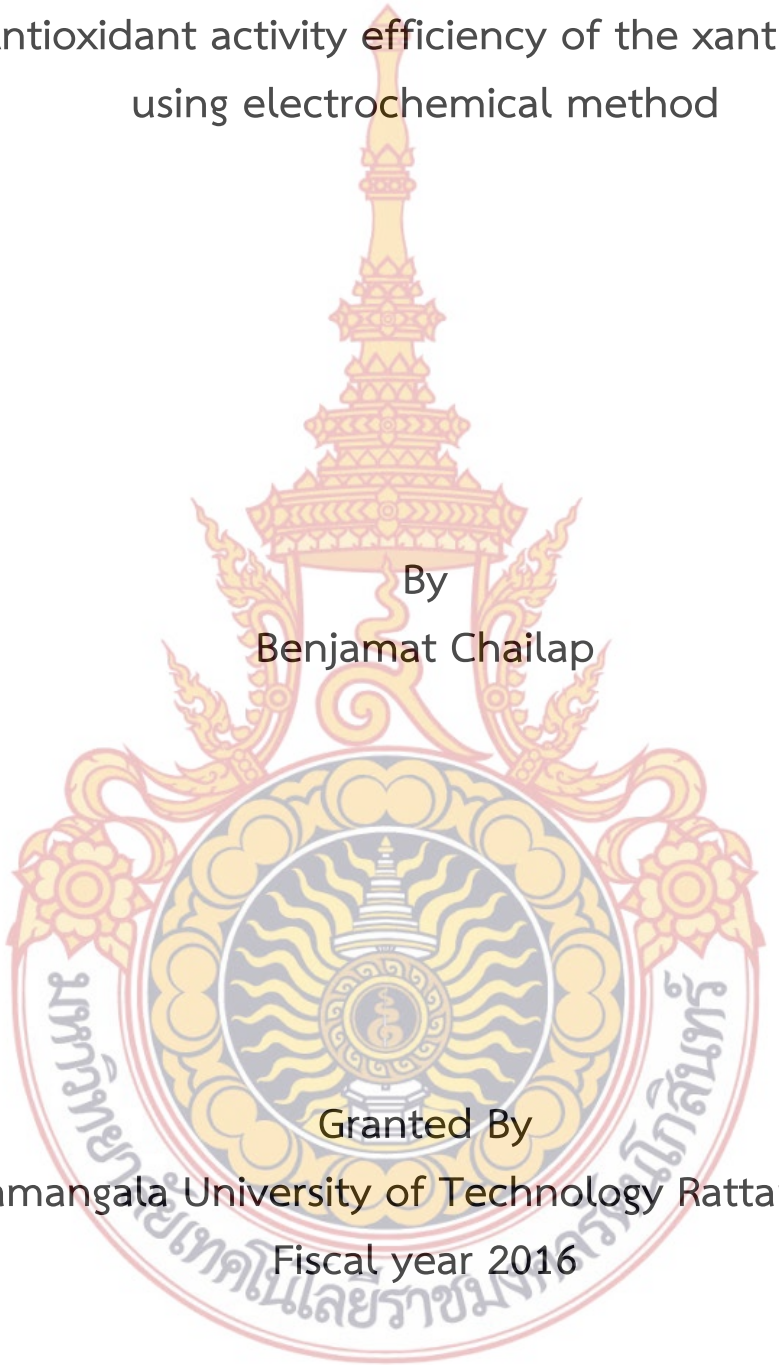
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2559

Antioxidant activity efficiency of the xanthone using electrochemical method

By

Benjamat Chailap



Granted By

Rajamangala University of Technology Rattanakosin

Fiscal year 2016

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง “ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มแซนโทนโดยวิธีทางเคมีไฟฟ้า” สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความร่วมมือของบุคคลากรหลายฝ่าย ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย ดร.ธเนศวร นวลใย แห่งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล สำหรับการทุ่มเทในการสกัด และแยกสารบริสุทธิ์ ตลอดจนคำปรึกษาในด้านต่างๆ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยและพัฒนาทุกๆ ท่านที่ประสานงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2559 และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวที่เป็นกำลังใจสำคัญในการทำงานครั้งนี้

เบญจมาส ไชยลาภ และคณะ

สิงหาคม 2559

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : A24/2559
ชื่อโครงการ : ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มแซนโทนโดยวิธีทางเคมีไฟฟ้า
ชื่อนักวิจัย : ดร.เบญจมาส ไชยลาภ และ ดร.ธเนศวร นวลใย

สารประกอบแซนโทน 7 ตัวประกอบด้วย Dulcisxanthone B (**1**), β-mangostin (**2**), 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-(3-methylbut-2-eyl)-xanthone (**3**), Cudratricusxanthone E (**4**), cochinchinone A (**5**), 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (**6**), และ cochinchinone B (**7**) แยกได้จากกิ่งของติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) และติ้วขน (*Cratoxylum formosum*) โครงสร้างของสารประกอบถูกพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปี (ประกอบด้วยเทคนิค ^{1}H, ^{13}C, ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}H HSQC และ ^{1}H-^{13}C HMBC) และเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา สารประกอบทุกตัวแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 9.50 to 134.41 μM โดยใช้เทคนิค DPPH assay ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารประกอบแซนโทนและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากวิธี DPPH assay สอดคล้องกับพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าเมื่อศึกษาโดยเทคนิค cyclic voltammetry สารประกอบ 4 และ 7 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อศึกษาด้วย DPPH assay และใช้ศักย์ในการออกซิเดชันต่ำกว่าสารอื่นๆ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารประกอบทั้งหมดสรุปได้ว่าหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C-6 มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ : สารประกอบแซนโทน, สารต้านอนุมูลอิสระ

Email Address : b_amat@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ : 1 ตุลาคม 2558 – 31 กันยายน 2559

Abstract

Code of project : A24/2559
Project name : Antioxidant activity efficiency of the xanthone using electrochemical method
Researcher name : Benjamat Chailap (Ph.D.) and Thanesuan Nuanyai (Ph.D.)

Seven isolated xanthones; Dulcisxanthone B (1), β-mangostin (2) Seven isolated xanthones; Dulcisxanthone B (**1**), β-mangostin (**2**), 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-(3-methylbut-2-eyl)-xanthone (**3**), Cudratricusxanthone E (**4**), cochinchinone A (**5**), 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (**6**), and cochinchinone B (**7**) were isolated form twigs of *Cratoxylum cochinchinense* and *Cratoxylum formosum*. The structure of all isolated compounds were elucidated by spectroscopic methods (^{1}H, ^{13}C, ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}H HSQC, and ^{1}H-^{13}C HMBC techniques) and compared with previous literatures. All compounds showed antioxidant activity with IC_{50} values ranging from 9.50 to 134.41 μM using DPPH assay. Relationship between structures of xanthones and their antioxidant activities using DPPH assay were corresponded with electrochemical behaviors using cyclic voltammetry. Compounds **4** and **7** displayed the highest antioxidant activity on DPPH assay and showed lower oxidation potentials compared to others compounds on cyclic voltammograms. Considering the structures of the compounds, It implied that the hydroxy group at C-6 was important role on antioxidant capacities.

,

Keywords: ***xanthone compounds, antioxidant***

Email Address : b_amat@hotmail.com

Period of project : 1 October 2015 – 31 September 2016

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ก
บทคัดย่อภาษาไทย		ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1	**บทนำ**	
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
	1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
	1.4 นิยามศัพท์	3
	1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	**ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	
	2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	5
	2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3	**วิธีดำเนินงานวิจัย**	
	3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	23
	3.2 เครื่องมือและสารเคมี	23
	3.3 วิธีการทดลอง	24
บทที่ 4	**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**	
	4.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยง (C. cochinchinense) และติ้วขน (C. formasum)	27
	4.2 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH	28
	4.3 การศึกษาด้วยเทคนิคเคมีไฟฟ้า	32

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

สารบัญ(ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5	**สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ**	
	5.1 สรุปผลการวิจัย	**40**
	5.2 อภิปรายผล	**40**
	5.3 ข้อเสนอแนะ	**41**
บรรณานุกรม		**42**
ภาคผนวก		**44**
ประวัติผู้วิจัย		**49**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร 1	28
2	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร 2	28
3	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร 3	29
4	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร 4	29
5	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร 5	29
6	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร 6	30
7	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร 7	30
8	แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของ trolox	30
9	ค่าความเข้มข้นของสาร 1-7 ที่สามารถยับยั้งในการเกิดอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50})	32
10	ค่าศักย์ไฟฟ้าของการออกซิเดชัน (E) ของสาร 1-7	37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH)	13
2	ศักย์ไฟฟ้าที่ให้ในไซคลิกโวลแทมเมททรี และไซคลิกโวลแทมโมแกรม	16
3	โครงสร้างหลักของสารประกอบ xanthone	18
4	โครงสร้างสารประกอบ xanthone ทั้ง 8 ตัว	19
5	กลไกการเปลี่ยนเป็นสารประกอบควิโนน (quinone) จากสารประกอบ xanthone	20
6	โครงสร้างของสารประกอบต่างๆ (Masek, 2011)	20
7	กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร flavonoids	21
8	โครงสร้างทางเคมีของ hydroxyxanthones ที่ศึกษาโดย Clementina	21
9	โครงสร้างสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยง (*C. cochinchinense*) ติ้วขน (*C. formosum*)	27
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสาร **1** และ **3**	31
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสาร **2, 5, 6** และ **7**	31
12	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **1** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	33
13	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **2** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	33
14	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **3** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	34
15	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **4** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	34
16	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **5** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	35
17	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **6** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 100 mV/s	35
18	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **7** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 100 mV/s	36
19	Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **1-7** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	36
20	โครงสร้าง และ Cyclic voltammograms ของสาร **1** และ **2** ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	37
21	โครงสร้าง และ Cyclic voltammograms ของสาร **3** และ **4** ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s	38
22	โครงสร้าง และ Cyclic voltammograms ของสาร **5, 6** และ **7** ในสารละลาย	39

10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบันให้ความสำคัญกับสุขภาพมากขึ้น เนื่องจากการมีความรู้เรื่องโรคภัยต่างๆ ที่เพิ่มขึ้น หนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ นั้นมาจากความไม่สมดุลของสารอนุมูลอิสระในร่างกาย ซึ่งอาจมีผลให้ชีวโมเลกุลในเซลล์ถูกออกซิไดซ์จนอาจสูญเสียการทำงาน และเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถหวนคืนได้ และเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย (Antolovich, 2002) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านออกซิเดชันอย่างมากมาย ไม่ว่าจะเป็นสารที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น และสารจากธรรมชาติซึ่งพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ในรูปของเอนไซม์ วิตามิน (เช่น วิตามินซี, อี และกลูตาไทโอน) และสารอื่นๆ (Antolovich, 2002) (Prior, 2005) (Huang, 2005) วิธีที่ใช้ศึกษาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีอยู่หลายวิธีโดยมีหลักการคล้ายคลึงกัน คือเป็นการวัดการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระไปยังอนุมูลอิสระที่ใช้ตรวจวัดได้ เช่น วิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH, การฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ ยังไม่สามารถอธิบายความต่างของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเชิงโครงสร้างของสารได้อย่างชัดเจน การใช้เทคนิคที่มีพื้นฐานทางเคมีรูปแบบอื่นมาประกอบการอธิบาย จึงมีความจำเป็น ทำให้เข้าใจกลไกของการต้านอนุมูลอิสระได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระนั้น มีคุณสมบัติอย่างหนึ่งคือสามารถให้อิเล็กตรอนได้ง่ายแก่สารอนุมูลอิสระแล้วหลังจากนั้นอนุมูลอิสระของสารต้านนั้นมีความเสถียร ไม่ทำปฏิกิริยาต่อไปอีก ดังนั้นคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นจึงสามารถศึกษาโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า เช่น เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตทรี (Cyclic voltammetry) (Kilmartin, 2001) โดยจากเทคนิคนี้จะได้ข้อมูลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยารีด็อกซ์ ตลอดจนถึงลักษณะของพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าจากไซคลิกโวทแทมโมแกรม (Cyclic Voltammogram) (Heinze, 1984)ซึ่งข้อมูลที่ได้จากเทคนิคนี้สามารถนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่ศึกษาได้

สารประกอบแซนโทน (Xanthone) เป็นสารกลุ่มฟีนอล อนุพันธ์ของแซนโทนหลายชนิดมีรายงานการวิจัยพบว่ามีประสิทธิภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Santos, 2010) สารกลุ่มนี้พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น มังคุด ติ้วเกลี้ยง และติ้วขน เป็นต้น ติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum*

cochinchinense) เป็นพรรณไม้ท้องถิ่นที่พบได้ในเขตอำเภอหัวหิน และบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตวังไกลกังวล และจากงานวิจัยในประจำปีงบประมาณ 2557 เรื่อง สารสกัดจากติ้วเกลี้ยงที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จากผลการวิจัยพบว่าสารจากติ้วเกลี้ยงมีการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และพบอนุพันธ์แซนโทนอีกหลายชนิด

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจในคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของอนุพันธุ์สารประกอบแซนโทนจากติ้วเกลี้ยงโดยพิจารณาจากพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าประกอบกับการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH จะมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของอนุพันธุ์ของสารแซนโทนกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาที่ได้เบื้องต้นคาดว่าจะสามารถใช้คาดคะเนคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบชนิดอื่นๆ ต่อไปได้นอกจากนี้ การทราบถึงกลไกการของการต้านอนุมูลอิสระที่ชัดเจน จะมีประโยชน์ต่อการนำสารต้านอนุมูลอิสระไปใช้ในด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง หรืออื่นๆ ได้อย่างตรงวัตถุประสงค์อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มแซนโทนที่ได้จากธรรมชาติ เปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระแบบวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH

1.2.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของอนุพันธุ์สารประกอบแซนโทนกับฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 สกัดและแยกอนุพันธุ์สารประกอบแซนโทนจากติ้วเกลี้ยง และติ้วขน (*Cratoxylum cochinchinense & C. formasum*) พร้อมทั้งพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคทาง
สเปกโทรสโกปี

1.3.2 ศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของอนุพันธุ์ของสารแซนโทนที่ได้ โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมททรี (CV)

1.3.3 ทดสอบฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของอนุพันธุ์สารแซนโทนด้วยเทคนิค DPPH assay

1.4 นิยามศัพท์ที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1 สารสกัดหยาบ (Crude) หมายถึง สารที่ได้จากการนำตัวอย่างพืชไปแช่ในตัวทำละลายและกรองนำส่วนที่เป็นของเหลวออกมาระเหยแห้ง

1.4.2 สารบริสุทธิ์ (Pure substance) หมายถึง สารเนื้อเดียวที่ประกอบไปด้วยสารเพียงชนิดเดียวไม่มีสารอื่นเจือปน

1.4.3 การสกัด (Extraction) หมายถึง กระบวนการแยก (separation) โดยใช้ของเหลวอีกชนิดหนึ่งเป็นตัวทำละลาย สารที่ต้องการแยกโดยให้ละลายออกมาในตัวทำละลาย

1.4.4 พิสูจน์ทราบโครงสร้าง (Structure identification) หมายถึง การนำข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสารเคมี มาประมวลผลและสามารถเขียนโครงสร้างทางเคมีของสารได้

1.4.5 สเปกโทรสโคปี (Spectroscopy) หมายถึง ผลจากอันตรกิริยาของแสงกับสสาร สามารถให้ข้อมูลในรูปของสเปกตรัมที่สามารถนำไปใช้ในการระบุโครงสร้างของโมเลกุลได้โดยการวัดความถี่ของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่ถูกสสารดูดกลืน เปล่งออกมา หรือกระเจิงออกมาเทียบเคียงรูปแบบของพลังงานจากการดูดกลืนหรือการเปล่งออกมากับรายละเอียดโครงสร้างของโมเลกุล

1.4.6 การแยกสาร (Separation) กระบวนการทำสารผสมให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยความแตกต่างของสมบัติทั้งทางกายภาพและเคมีมาใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกสารผสม เช่น การกรอง การกลั่น การระเหย การตกตะกอน การตกผลึก การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น

1.4.7 โครมาโทรกราฟี (Chromatography) หมายถึง เทคนิคการแยกสารผสมโดยอาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ โดยสารที่ต้องการนำมาแยกโดยวิธีนี้จะมีสมบัติการละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน และตัวถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน

1.4.8 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-Layer Chromatography) หมายถึง การแยกของผสมโดยอาศัยการที่ต่างกันของเฟสคงที่โดยเฟสคงที่เป็นของแข็ง เฟสคงที่ที่ที่นิยมใช้คือ silica gel ($SiO_2.XH_2O$) และ alumina (Al_2O_3) ในขณะเดียวกันเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวจะพาสารให้เคลื่อนที่ เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกันจะได้รับแรงดึงและแรงผลักดันต่างกัน ดังนั้นสารแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อย จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นเป็นแถบๆ

1.4.9 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) หมายถึง เทคนิคการแยกสารผสม โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่และถูกดูดซับที่ต่างกัน อลูมินาหรือซิลิกาเจลถูกบรรจุในคอลัมน์ แล้วเทสารผสมที่เป็นสารละลายของเหลว ลงสู่คอลัมน์ สารผสมจะผ่านคอลัมน์ช้าๆ โดยตัวทำละลายซึ่ง

เป็นเฟสเคลื่อนที่เป็นผู้พาไป สารในเฟสอยู่กับที่จะดูดซับสารในสารผสมไว้ส่วนประกอบใดของสารผสมที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ส่วนที่ถูกดูดซับไม่ดีจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ทำให้สารผสมแยกจากกันได้

1.4.10 อนุมูลอิสระ (free radicals) สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล

1.4.11 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หมายถึง สารที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือยับยั้งปฏิกิริยาที่มีออกซิเจน หรือเปอร์ออกไซด์เป็นตัวกระตุ้นทางเคมี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสาร และฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งจัดเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ โดยมีพื้นฐานมาจากข้อมูลการวิเคราะห์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH และเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี

1.5.2 สามารถนำองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นไปคาดคะเนคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารชนิดอื่นได้ เมื่อพิจารณาในเชิงโครงสร้างของสาร

1.5.3 สามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ หรือวารสารระดับชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ

1.5.4 สามารถพัฒนาเป็นแนวทางในการคาดคะเนการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น อาหาร ยา เครื่องสำอาง เป็นต้น ตลอดจนเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ของชุมชน อาทิเช่น เครื่องสำอาง อาหารเสริม ที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์สมุนไพร

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 อนุมูลอิสระ

2.1.1.1 ความหมายและแหล่งที่มา

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล เกิดได้จากปัจจัยภายในร่างกายเช่น กระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย และปัจจัยภายนอก (Antolovich, 2002) เช่น

- มลพิษต่างๆ เช่น โอโซน โลหะหนัก ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์

- การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย หรือ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น

- จากรังสี รังสีอุลตราไวโอเลต รังสียูวี รังสีแกมมา

- กระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียม ไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง

- จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol)

2.1.1.2 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ

การเกิดอนุมูลอิสระโดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับอะตอมของออกซิเจน, กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid), ฟอสโฟไลปิด (phospholipids), โคเลสเตอรอล (cholesterol) และ ดีเอ็นเอ (DNA) กระบวนการออกซิเดชันของไขมันมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของอาหาร และทำให้เกิดกระบวนการ oxidative modification ของไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein, LDL) (Antolovich, 2002)

กระบวกนการออกซิเดชันของไขมันเกิดผ่าน 3 ปฏิกิริยาคือ (1) non-enzymatic free radical-mediated chain reaction, (2) non-enzymatic, non-radical photo-oxidation, (3) enzymatic reaction (Antolovich, 2002) วิธีที่ (1) ถือเป็นปฏิกิริยาทั่วไปในการเกิดอนุมูลอิสระที่

นำไปสู่จุดเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ก่อให้เกิดการทำลายอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ลักษณะที่สำคัญของกระบวนการออกซิเดชันผ่าน enzymatic free radical-mediated chain reaction ประกอบด้วย กระบวนการเริ่มต้น (Initiation), กระบวนการแพร่กระจาย (Propagation), กระบวนการแตกแขนง (Branching), และกระบวนการสิ้นสุด (Termination) (Antolovich, 2002) โดยกระบวนการเหล่านี้อาจมีจุดเริ่มต้นโดยสิ่งเร้าภายนอกเช่น ความร้อน แสง รังสีที่แตกตัวเป็นไอออน (ionizing radiation) หรือจากสารเคมีเช่นไอออนของโลหะ หรือ โปรตีนที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ (metalloproteins) (Antolovich, 2002)

กระบวนการเริ่มต้น (Initiation): $LH + R\bullet \longrightarrow L\bullet + RH$

โดย LH คือ โมเลกุลของสารตั้งต้น เช่นไขมัน

R• คือ อนุมูลอิสระที่กระตุ้นให้เกิดการออกซิเดชัน (Initiating oxidizing radical) การออกซิเดชันของไขมันจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง (Highly reactive allyl radical, L•) ที่จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอย่างรวดเร็วเพื่อเกิดเป็นอนุมูลอิสระไขมันของ peoxyl (LOO•)

กระบวนการแพร่กระจาย (Propagation): $L\bullet + O_2 \longrightarrow LOO\bullet$

$LOO\bullet + LH \longrightarrow LOOH + L\bullet$

อนุมูลอิสระของ peroxyl (LOO•) จะเป็นพาหะให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่จะออกซิไดซ์ไขมันต่อไป หรือทำให้เกิดไขมัน hydroperoxides (LOOH) ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบอื่นๆ อีกหลายชนิดเช่น แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน และอนุมูลอิสระอื่นๆ รวมถึงอนุมูลของ alkoxyl (LO•)

กระบวนการแตกแขนง (Branching): $LOOH \longrightarrow LO\bullet + HO\bullet$

$2LOOH \longrightarrow LOO\bullet + LO\bullet + H_2O$

การแตกตัวของไขมัน hydroperoxides โดยทั่วไปมักเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาโดยโลหะทรานซิชัน หรือปฏิกิริยาที่คล้ายคลึงกันของ hydrogen peroxide เกิดเป็นอนุมูลอิสระไขมันของ peoxyl (LOO•) และ alkoxyl (LO•)

$$LOOH + M^{n+} + H^{+} \longrightarrow LO\bullet + M^{(n+1)+} + H_2O$$

$$LOOH + M^{(n+1)+} + OH^{-} \longrightarrow LOO\bullet + M^{n+} + H_2O$$

กระบวนการสิ้นสุด (Termination) เกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product) อีกต่อไป

กระบวนการสิ้นสุด (Termination): $LO\bullet + LO\bullet \longrightarrow$ non-radical products

$LOO\bullet + LOO\bullet \longrightarrow$ non-radical products

$LO\bullet + LOO\bullet \longrightarrow$ non-radical products

2.1.1.3 ผลกระทบจากอนุมูลอิสระ

กระบวนการออกซิเดชันในร่างกายและในอาหารมีความสำคัญให้ผู้คนได้ตระหนักมากขึ้น กระบวนการออกซิเดชันในระบบเมทาบอลิซึม (oxidative metabolism) มีความจำเป็นสำหรับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ผลข้างเคียงของกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับการเกิดอนุมูลอิสระและอนุภาคอื่นๆ ของออกซิเจนที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยา (Reactive oxygen species, ROS) ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการออกซิเดชัน (oxidative changes) เมื่อเกิดอนุมูลอิสระส่วนเกินขึ้นจะสามารถเอาชนะเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ป้องกัน (เช่น superoxide dismutase, catalase และ peroxidase) และเป็นสาเหตุให้เกิดการทำลายตลอดจนถึงทำให้เซลล์ตายได้ (ตัวอย่างเช่นกระบวนการ apoptosis) โดยเกิดการออกซิเดชันของเนื้อเยื่อไขมัน, โปรตีนในเซลล์, ดีเอ็นเอ, และเอนไซม์ นำไปสู่การหยุดทำงานของกระบวนการหายใจภายในเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้นอนุภาคที่ว่องไวของออกซิเจน (ROS) จะมีผลการส่งสัญญาณภายในเซลล์อีกด้วย กระบวนการออกซิเดชันสามารถเกิดในอาหารได้อีกด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียที่มาจากปฏิกิริยาเคมี เกิดเป็นการเหม็นหืน (rancidity) หรือ การเสื่อมสภาพของอาหารไม่ว่าจะเป็นทางด้าน สารอาหาร สี รส ลักษณะของอาหาร และความปลอดภัยของอาหาร (Antolovich, 2002)

อนุมูลอิสระส่วนเกินจากกระบวนการเมทาบอลิซึมมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ภายในเซลล์ ก่อให้เกิดอันตรายแก่เซลล์โดยอนุมูลอิสระจะทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์หลายประเภทเช่น ลิพิด (lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน(collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) (Malagutti, 2006)

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer'sdisease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Ames, 1993)

2.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

2.1.2.1 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หมายถึง สารใดๆ ที่เมื่อปรากฏอยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดการออกซิเดชัน (oxidazable substance) สารต้านอนุมูลอิสระจะชะลอหรือยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของสารที่สามารถเกิดการออกซิเดชันได้ แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ (1) chain breaking oxidants และ (2) preventative antioxidants ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถลดอัตราเร็วของการเกิดออกซิเดชันได้ (Ames, 1993) นอกจากนี้ยังมีความหมายอื่นๆ ของสารต้านอนุมูลอิสระเช่น สารต้านอนุมูลอิสระหมายถึง สารที่ต่อต้านกระบวนการออกซิเดชัน หรือยับยั้งปฏิกิริยาที่มีออกซิเจนหรือเปอร์ออกไซด์เป็นตัวช่วยในการเกิดปฏิกิริยา (Huang, 2005) หรือหากมองในทางชีวภาพ สารต้านอนุมูลอิสระจะหมายถึง สารสังเคราะห์หรือสารที่ได้จากธรรมชาติ ที่เมื่อเติมลงในผลิตภัณฑ์แล้วจะช่วยป้องกันหรือชะลอความเสื่อมที่เกิดจากการกระทำของออกซิเจนในอากาศ ในทางชีวภาพและทางยา สารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นเอนไซม์หรือสารอินทรีย์ ตัวอย่างเช่น วิตามิน E หรือ เบต้า แคโรทีน (β-carotene) (Huang, 2005)

สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในหลายๆ ผลิตภัณฑ์ อาทิเช่น ไขมัน น้ำมัน ผลิตภัณฑ์อาหาร สบู่ เพื่อชะลอกลิ่นเหม็นหืน ถูกนำมาใช้ในแก๊สโซลีนและผลิตภัณฑ์อื่นๆ จากปิโตรเลียมก็จะช่วยชะลอการเกาะตัวเป็นยาง และการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่ไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้ยังช่วยยืดอายุการใช้งานของยาง (Huang, 2005) ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระในยางและพลาสติกเช่น สารฟีนอลที่มีโครงสร้างเกะกะ หรือเอมีน

หากพิจารณาในแง่ของอาหาร หรือโภชนาการ สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร (Dietary antioxidant) จะช่วยลดผลเสียของอนุภาคที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น อนุภาคที่ว่องไวของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และอนุภาคที่ว่องไวของไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) ที่มีผลเสียต่อกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายมนุษย์ เช่นสารต้านอนุมูลอิสระอาจจะช่วยป้องกันร่างกาย โดยเกิดการรวมตัวกับอนุมูลอิสระเป็นสารอื่นที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาที่เป็นผลเสียต่อร่างกายได้ (Huang, 2005)

2.1.2.2 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกได้เป็น สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural Antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural Antioxidants) พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ อาจมีได้หลายชนิด เช่น

- เอนไซม์ เช่น glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำ ให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน O_2• เป็น H_2O_2 (Prior, 2005) (Huang, 2005)
- วิตามิน เช่น วิตามินซี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) พบในพืชผักสีเขียว ผลไม้รสเปรี้ยว วิตามินอี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) พบในน้ำมัน และเมล็ดพืชชนิดต่างๆ กลูต้าไทโอน (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึมและเมมเบรน) (Huang, 2005)
- สารอื่นๆ เช่น carotenoids

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic Antioxidants) เช่น สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propylgallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone สารเหล่านี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป มีข้อดีคือ มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่ข้อเสียก็คือมีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค

2.1.2.3 กลไกในการต้านอนุมูลอิสระ

ในทางเคมีนั้น สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นได้เอง (Autoxidation) ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระระหว่างออกซิเจนและสารตั้งต้นอื่นๆ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพจะเป็นตัวทำลายอนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่

ดังนั้นกลไกในการยับยั้งอนุมูลอิสระจึงมีได้หลากหลายแบบ เช่น

1) ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) เช่น ROS/RNS scavengers

2) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching)

3) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation)

4) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

5) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์(enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น

ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ (Antolovich, 2002)

$$L\bullet + AH \longrightarrow LH + A\bullet$$

$$LOO\bullet + AH \longrightarrow LOOH + A\bullet$$

$$LO\bullet + AH \longrightarrow LOH + A\bullet$$

โดย อนุมูลอิสระกำหนดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวสูง (Highly reactive allyl radical, L•) อนุมูลอิสระไขมันของ peoxyl (LOO•) และ alkoxyl (LO•) และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปขัดขวางกระบวนการกระจายของปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยการเกิดสารประกอบ peroxy ของสารต้านอนุมูลอิสระ

$$A\bullet + LOO\bullet \longrightarrow LOOA$$

$$A\bullet + LO\bullet \longrightarrow LOA$$

2.1.3 **การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity Determination**

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืช หรืออาหารต่างๆ มีความซับซ้อนในด้านขององค์ประกอบ การแยกสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งเหล่านี้จึงใช้ต้นทุนสูง และยังไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงมีวิธีมาตรฐานสำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนา หาวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันโรคจึงได้รับความสนใจ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายวิธี แต่หากพิจารณาตามปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องจะสามารถแบ่งกลุ่มการวิเคราะห์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ วิธีที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอะตอมของไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT) และวิธีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน (Electron transfer, ET) (Huang, 2005) แต่ละวิธีนั้นมีความต่างกันในแง่ของ สารตั้งต้น (substrates), probes, สภาวะในการทำปฏิกิริยา (reaction condition) ดังนั้นการเปรียบเทียบผลการหาสารต้านอนุมูลอิสระของแต่ละวิธีจึงเป็นสิ่งที่ยากมาก รายงานการเปรียบเทียบข้อดี ข้อเสีย และความเหมาะสมของแต่ละวิธี เพื่อที่จะใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการหาสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก

2.1.3.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง มีหลายวิธี (พันธุ์สวรรค์, 2556) เช่น

1) การทำให้เกิดสี (Colorimetric Assay) เป็นการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลต่างๆ โดยนำสารต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างและดูสีที่เกิดขึ้น เช่น

- Shinoda test เป็นการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (cyanidins reaction) โดยการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างกับผงแมกนีเซียมหรือวงแหวนแมกนีเซียม (magnesium ribbon) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และออกทิลแอลกอฮอล์ (octylalcohol) ซึ่งจะเกิดการแยกชั้น ถ้าเกิดสีแดง

แสดงว่ามีสารจำพวกฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาวาโนน(flavanone) ฟลาวาโนนอล (flavanonol) หรือแซนโทน (xanthone) หรือถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีสารจำพวกฟลาโวน (flavones) ชาลโคน (chalcone) หรือออโรน (ourone) (พันธุ์สวรรค์, 2556)

- **Pew test** เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับผงสังกะสี (zinc dust) และกรดไฮโดรคลอริก ถ้าเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามีสารฟลาวาโนนอล (flavanonol) และฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ (flavonol-3-glycoside) แต่ถ้าเป็นสีจาง ๆ แสดงว่ามี
สารฟลาวาโนน (flavanone) และฟลาโวนอล(flavonol)

ทั้งสองวิธีมีข้อดีคือ ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ แต่มีข้อเสียคือ ความไว และความแม่นยำต่ำ เหมาะสำหรับวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ หากสารตัวอย่างประกอบด้วยสารหลายชนิดผสมกัน สีที่เกิดขึ้นสามารถรบกวนกันได้ (พันธุ์สวรรค์, 2556)

2) **Thin Layer Chormatography (TLC)** สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้วสามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ชาลโคน (chalcone) และออโรน(ourone) แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยาต่อกับไอของแอมโมเนีย หรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) หรือฉีดพ่นด้วยสารต่าง ๆ เช่นสารละลายโฟลินสารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก สารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต สารละลายกิบบส์ (Gibbs reagent) และสารละลาย DPPH
ข้อดี คือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่างสามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี ข้อเสีย คือ มีความไวและความแม่นยำต่ำ และในกรณีที่องค์ประกอบต่าง ๆ ในตัวอย่างมีค่า Rf ใกล้เคียงกันมาก จะไม่สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากกันได้ หรือแยกได้แต่ไม่บริสุทธิ์ (พันธุ์สวรรค์, 2556)

3) **High Performance Liquid Chromatography (HPLC)** วิธีนี้ต้องมีสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบโดยสารชนิดเดียวกันจะมีพีคออกมาในระยะเวลา(retention time) เดียวกันเสมอ ข้อดีของ คือ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน และวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำ ๆ ข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากเครื่อง HPLC มีราคาค่อนข้างแพง และmobile phase ต้องใช้ประเภท HPLC grade (พันธุ์สวรรค์, 2556)

2.1.3.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

วิธีที่นิยมในการวิเคราะห์เชิงปริมาณคือ วิธีที่มีพื้นฐานอยู่บนการถ่ายเทอิเล็กตรอน (Electron Transfer-Based Assays, ET-Based Assays) ซึ่งมีอยู่หลากหลายวิธี โดยวิธีเหล่านี้

เกี่ยวข้องอยู่กับองค์ประกอบ 2 อย่างในปฏิกิริยา คือ สารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) และตัวออกซิไดซ์ (oxidant) หรือ ตัวที่ทำหน้าที่วัด (Probe) นั่นเอง การถ่ายโอนอิเล็กตรอนเกิดขึ้นดังนี้

Probe (oxidant) + **e** (from antioxidant) $\longrightarrow$ reduced probe + oxidized antioxidant (Huang, 2005)

ตัวที่ทำหน้าที่วัด หรือตัวออกซิไดซ์ จะดึงอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของตัวออกซิไดซ์นั่นเอง โดยจะให้ค่าการดูดกลืนแสงของตัวออกซิไดซ์ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสีจะเปลี่ยนแปลงไปมากหรือน้อยนั้นแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระนั่นเอง โดยปฏิกิริยานี้ถือว่าสิ้นสุดเมื่อสีของสารละลายไม่มีการเปลียนแปลง (Huang, 2005) หรือพูดอย่างง่ายคือ นำอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน มาเป็นตัวที่ทำหน้าที่ตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง (พันธุ์สวรรค์, 2556) การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนในหน่วย Absorbance (ΔA) จะถูกนำมาพล็อตกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ จะได้เส้นตรง ความชันของเส้นตรง จะบ่งบอกถึงความสามารถในการรับอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระนั่นเอง [3] หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ (1) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และ (2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 % (IC_{50}, 50 % of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ μM/mg, mM/mg, μM/mL, mM/mL เป็นต้น

1) **การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช** (2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Capacity Assay) เป็นวิธีการหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ง่ายและแม่นยำ โดยส่วนใหญ่ใช้กับสารสกัดจากพืชและผลไม้ อนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช (DPPH•, diphenyl-picryhydrazyl radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว โดยมีอิเล็กตรอนเดี่ยวบนอะตอมของไนโตรเจน (N) และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้ เครื่องยูวี วิซิเบิล สเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (UV-vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆจนเป็นสีเหลือง หรืออาจใช้การวัดโดยเครื่อง electron spin resonance (EPR) ก็ได้ โดยกลไกในการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าเกิดจากการถ่ายโอนอะตอมของไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระไปยังอนุมูลอิสระ DPPH ดังแสดง (พันธุ์สวรรค์, 2556)

$$DPPH\bullet + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A\bullet$$

วิธีทดลองโดยใช้ DPPH assay โดยทั่วไปมีขั้นตอนดังนี้คือ นำสารละลายของ DPPH (3.9 ml, 25 mg/L) ที่ละลายในเมทานอล มาผสมกับสารละลายของสารตัวอย่าง (0.1 mL) ทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา หรือจนกระทั่งสีของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ จากนั้นคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ก่อนใส่สารตัวอย่าง ดังนี้

$$\%DPPH_{REM} = 100 \times [DPPH]_{REM}/[DPPH]_{T=0}$$

ร้อยละของ DPPH ที่เหลืออยู่ ($\%DPPH_{REM}$) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลงลง 50% จะถูกกำหนดเป็น EC_{50} [2] ตัวบ่งชี้อื่นๆ เช่น TC_{50} คือเวลาที่ใช้ในการเข้าสู่ steady state กับ EC_{50} และพฤติกรรมทางจลนศาสตร์ แสดงโดยตัวบ่งชี้ที่เรียกว่า “antiradical efficiency (AE)” หาได้จาก

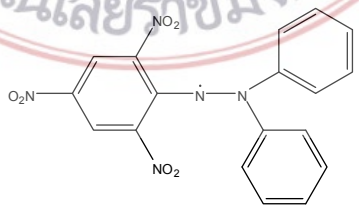
$$AE = 1/ EC_{50}\ TC_{50}$$

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรล็อกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ μM/mg

วิธีนี้มีข้อดีคือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว และใช้เพียงเครื่อง ยูวี วิซิเบิล สเปกโตโฟโตรมิเตอร์ ส่วนข้อเสียคือ การแปลผลของวิธีนี้ทำได้ลำบากเมื่อสารที่นำมาวัดมีการดูดกลืนแสงที่ให้สเปกตรัมที่ซ้อนทับกับ DPPH นอกจากนี้ DPPH• ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยา และมีโครงสร้างที่ค่อนข้างเกะกะ จึงอาจมีผลให้มีการตอบสนองต่ออนุมูลอิสระอื่นๆ ได้เฉื่อย ยิ่งไปกว่านั้น สีของ DPPH อาจจางลงได้โดยตัวรีดิวซ์หรือการเกิด H transfer (Prior, 2005)

เนื่องจากความเฉื่อยของ DPPH จึงเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน(interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

อย่างไรก็ตาม แม้จะมีข้อเสียอยู่บ้าง แต่วิธีนี้ก็มีการนำไปใช้อย่างแพร่หลาย



รูปที่ 1. โครงสร้างทางเคมีของ 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH)

2) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radicalcation decolorization assay) อนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS•+ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจางABTS•+ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS•+ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการ 6) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS•+ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH

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

วิธีนี้มีข้อดี คือ ABTS•+ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำ ละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงpH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ ABTS•+ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

3) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ (ดังสมการ 7) ซึ่ง $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำ ให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ประกอบด้วย นำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเทตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+} + antioxidant \rightarrow [Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+} (\text{สมการ 7})$$

วิธีนี้มีข้อดีคือ ทำได้หลายสารตัวอย่าง พร้อม ๆ กัน ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แต่มีข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำ ปราศจากไอออน (พันธุ์สวรรค์, 2556)

2.1.4 การใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ

เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ได้รับความสนใจและการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสาร กับศักย์ไฟฟ้าของสารที่ถูกออกซิไดซ์ ตลอดจนใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร โดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้านี้มีข้อดีคือ สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ง่าย เป็นวิธีที่มีความไวสูง ใช้ต้นทุนในการวิเคราะห์ที่ต่ำ และใช้เวลาในการเตรียมสารตัวอย่างไม่มากนักเมื่อเทียบกับเทคนิคทางโครมาโทกราฟฟีและสเปกโตรเมทรี

สารต้านอนุมูลอิสระนั้น มีคุณสมบัติอย่างหนึ่งคือสามารถให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระแล้วหลังจากนั้นอนุมูลอิสระของสารต้านนั้นมีความเสถียร ไม่ทำปฏิกิริยาต่อไปอีก สารต้านอนุมูลอิสระสามารถประพฤติตนเหมือนตัวรีดิวซ์ (reduction agents) เมื่ออยู่ในสารละลายสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายบนขั้วไฟฟ้าเฉื่อย (inert electrodes) ความสัมพันธ์ระหว่างพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารประกอบ กับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากหากใช้ศักย์ไฟฟ้าต่ำในการทำให้สารประกอบเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (สารประกอบให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นง่าย) ก็หมายความว่าสารมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง หนึ่งในเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่ได้รับความสนใจในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระคือ เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตทรี (Cyclic voltammetry) นั่นเอง

2.1.4.1 เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry)

ไซคลิกโวลแทมเมตรี (cyclic voltammetry) เรียกย่อ ๆ ว่าเทคนิค CV เป็นเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ทางด้านสาขาเคมี และสาขาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยสามารถใช้ศึกษาในด้านที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรีดอกซ์ (redox process) การเกิดสารตัวกลาง (intermediates) และความคงตัวของสารผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรีประกอบด้วยเซลล์เคมีไฟฟ้า 3 ขั้ว (Heinze, 1984) คือ

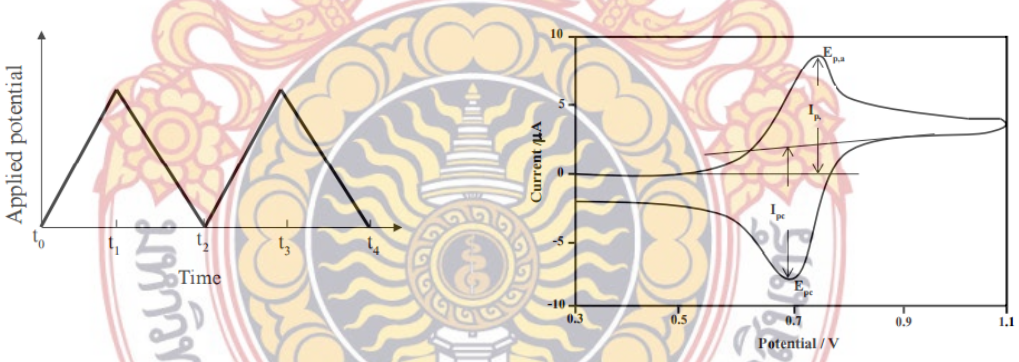
1) ขั้วไฟฟ้าใช้งาน (Working electrode: WE) จะมีขนาดของขั้วไฟฟ้าที่มีขนาดเล็กเพื่อ ให้มีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับสารตัวอย่างน้อย ๆ ทำให้สามารถเกิดสภาวะโพลาไรเซชันตลอด การวิเคราะห์ มักใช้ขั้วไฟฟ้าที่เป็นโลหะเฉื่อย เช่น แพลทินัมหรือทอง กลาสสิคาร์บอน

2) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Reference electrode: RE) เป็นขั้วไฟฟ้าที่ใช้เทียบศักย์ไฟฟ้าที่ต้องให้กับ ขั้วไฟฟ้าใช้งาน ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงนี้จะมีค่าศักย์ที่แน่นอนไม่แปรหรือขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในวงจร ไม่ขึ้นกับส่วนประกอบของสารตัวอย่าง ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่ดีต้องมี ส่วนประกอบคงตัว ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายเมื่อเก็บไว้ และไม่มีแปรเปลี่ยนตามอุณหภูมิด้วย ปกติแล้ว ค่าศักย์ของวงจรที่อ่านได้จากอุปกรณ์วัดสัญญาณ ไฟฟ้าเป็นค่าที่เกิดจากผลต่างของศักย์จากขั้ว ไฟฟ้าทั้งสองของวงจรอาจเรียกว่าศักย์ของวงจรที่วัดได้นี้ว่า ค่าศักย์สัมพันธ์ (Relative potentials) ถ้าขั้วไฟฟ้าตัวหนึ่งของ

วงจรเป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่รู้ค่าแน่นอน ย่อมทำให้สามารถหาค่าศักย์ของอีก ขั้วไฟฟ้าที่ต่อในวงจรซึ่งเป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน

3) ขั้วไฟฟ้าช่วย (Counter electrode: CE) จะมีคุณลักษณะที่เฉพาะคือ ทำหน้าที่เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี เป็นขั้วที่รับพลังงานไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าใช้งาน ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาเคมีของสารตัวอย่างที่ขั้วไฟฟ้าจุ่มอยู่แล้วส่งต่อพลังงานที่รับได้เข้าสู่เครื่องวัดคุมศักย์ไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้าช่วยนี้ไม่มี ส่วนเกี่ยวข้องหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้นในขณะเกิดปฏิกิริยาของสารตัวอย่างระหว่าง การวิเคราะห์ ขั้วไฟฟ้าช่วยมักมีพื้นที่ผิวมาก ๆ เพื่อให้การนำไฟฟ้าเป็นไปได้ดี วัสดุที่ใช้ทำขั้วไฟฟ้า ชนิดนี้ได้แก่ ลวดแพลทินัมหรือแผ่นแพลทินัม กลาสสิคาร์บอน และกราไฟต์

รูปแบบของศักย์ไฟฟ้าแบบไซคลิกโวลแทมเมตรีที่ให้กับเซลล์เคมีไฟฟ้าซึ่งจุ่มอยู่ในสารละลายที่อยู่นิ่ง มีลักษณะเป็นรอบรูปสามเหลี่ยม จากนั้นวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น เมื่อพลอตกราฟระหว่างแกนตั้งซึ่งเป็นศักไฟฟ้าและแกนนอนซึ่งเป็นเวลา หากเราให้ศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไปจะเรียกศักย์ไฟฟ้านี้ว่า “การแสกนไปข้างหน้า” (forward scan) ซึ่งจะทำให้สารเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเมื่อแสกนไปถึงจุดๆ หนึ่งซึ่งกำหนดไว้ แล้วศักย์ไฟฟ้าก็จะเริ่มลดลงด้วยอัตราการแสกนเท่าเดิม จะเรียกศักย์ไฟฟ้านี้ว่า “การแสกนย้อนกลับ” (reverse scan) ซึ่งจะทำให้สารเกิดปฏิกิริยารีดักชัน จนกระทั่งศักย์ไฟฟ้ามีค่าเท่ากับศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นจะได้เป็นหนึ่งรอบ



รูปที่ 2. แสดงศักย์ไฟฟ้าที่ให้ในไซคลิกโวลแทมเมทรี และไซคลิกโวลแทมโมแกรม

พารามิเตอร์ที่สำคัญในไซคลิกโวลแทมโมแกรมคือ ค่าศักย์ไฟฟ้าสูงสุด (E_{pc} , E_{pa}) และกระแสสูงสุด (i_{pc} , i_{pa}) ของสัญญาณแบบแคโทดิกและแอโนดิกตามลำดับ หากปฏิกิริยาที่สาร ออกซิแดนท์รับอิเล็กตรอนหรือเกิดปฏิกิริยารีดักชัน มีอัตราเร็วเท่ากับสารรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอน หรือ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเรียกปฏิกิริยาแบบนี้ว่า เป็นปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าแบบย้อนกลับได้

(electrochemically reversible) พบว่าระยะห่างระหว่างพีค (peak separation) จะมีค่าเท่ากับ ΔE_p ดังสมการ

$$\Delta Ep = [Epa - Epc] = 2.303\ RT/nF$$

ในปฏิกิริยาแบบสามารถย้อนกลับได้ ถ้าทำการศึกษาที่ 25 ºC ด้วยจำนวน อิเล็กตรอนเท่ากับ n พบว่า E_p จะมีค่าเท่ากับ 0.0592/nV หรือประมาณ 60 mV ต่อหนึ่งอิเล็กตรอน สำหรับในกรณีที่ปฏิกิริยาที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversiblity) ซึ่งมีอัตราการแลกเปลี่ยน อิเล็กตรอนที่ค่อนข้างช้า จะพบว่ามีค่า $\Delta Ep > 0.0592/n$ V หรือโดยประมาณเท่ากับ 70 mV ต่อหนึ่ง หน่วยอิเล็กตรอน ข้อมูลที่ได้จากเทคนิคนี้สามารถนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารกับกระบวนการทางเคมีที่เกิดขึ้นที่ผิวหน้าของอิเล็กโทรด ตลอดจนถึงการนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่ศึกษาได้

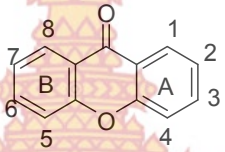
2.1.4.2 เทคนิคสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี(Square Wave Voltammetry)

เทคนิคสแควร์เวฟโวลแทมเมตรี(Square Wave Voltammetry) เรียกโดยย่อว่า SWV เป็นประเภทหนึ่งในพัลส์โวลเทมเมทรี (Pulse voltammetry) ใช้เซลล์เคมีไฟฟ้าแบบ 3 ขั้วเช่นเดียวกับเทคนิค CV แต่จะมีความต่างที่รูปแบบการให้ศักย์ไฟฟ้าโดยให้ศักย์ในรูปของขั้นบันไดบนพัลส์แบบตู้รถไฟและ ลักษณะของ voltammogram ที่ได้ ซึ่งแกนตั้งเป็นศักย์ไฟฟ้า และแกนนอนเป็นเวลาเช่นเดียวกับ cyclic voltammogram แต่ความสูงของพีกสแคร์เวฟโวลแทมโมแกรมจะแปรผันโดยตรงกับ สัดส่วนของความเข้มข้นและศักย์ไฟฟ้าของพีกจะสอดคล้องกับศักย์ไฟฟ้าของไซคลิกโวลแทม เทคนิคนี้มีข้อดีคือ มีความเร็วมาก และมีความไวสูงมากสามารถตรวจวัดได้ถึง 10^{-7} ถึง 10^{-8} โมลาร์

2.1.5 สารประกอบแซนโทน (Xanthone)

สารประกอบแซนโทน (Xanthone) เป็นสารประกอบฟีนอลชนิดหนึ่ง มีโครงสร้างเป็นวง 3 วง (tricyclic scaffold) พบได้ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่นจากติ้วเกลี้ยงซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ที่สามารถพบได้ทั่วไปบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตวังไกลกังวล (ธเนศวร นวลใย, 2558) มีการรายงานว่าอนุพันธุ์ของแซนโทนที่พบได้ในธรรมชาติแสดงคุณสมบัติทางชีวภาพและทางยา เช่นมีฤทธิ์กันภูมิแพ้ (anti-allergic), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ยาต้านมาลาเรีย (antimalarial), ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial), ฤทธิ์ต้านเนื้องอก (antitumour) และยังมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์หลายชนิด (Santos, 2010) นอกจากนี้สารประกอบแซนโทนสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระของแซนโทนมีทั้งดักจับ

อนุมูลอิสระของอนุมูลว่องไวปฏิกิริยาออกซิเจนและไนโตรเจน จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่โปรออกซิเดนท์ ความหลากหลายทางโครงสร้างของอนุพันธุ์ของแซนโทน ทำให้สารแซนโทนแต่ละตัวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน การศึกษาปัจจัยทางโครงสร้างที่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างในการต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นเรื่องที่ท้าทายและน่าสนใจอย่างยิ่ง สารประกอบแซนโทนสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ (redox-active compound) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของแซนโทน เช่นจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซี โดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าจึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจมาไม่นานนี้



รูปที่ 3. แสดงโครงสร้างหลักของสารประกอบ xanthone

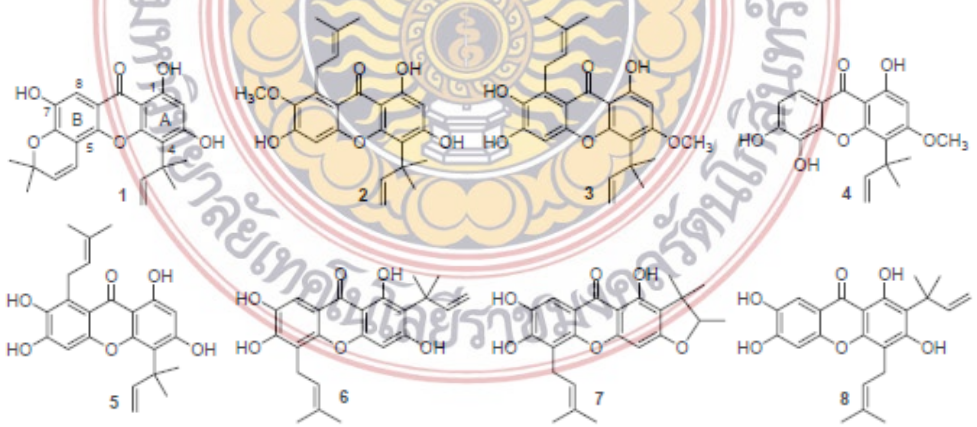
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีรายงานสารประกอบ xanthone บริสุทธิ์ที่แยกได้จากติ้วเกลี้ยงมากมาย โดยสารประกอบ xanthone มีความแตกต่างกันอย่างหลากหลายทางโครงสร้าง หมู่แทนที่ ซึ่งนำไปสู่ความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพ ไม่ว่าจะเป็นการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตลอดจนถึงการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะเห็นได้ว่าความหลากหลายทางโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของติ้วเกลี้ยงนั้น ปัจจัยหนึ่งก็ขึ้นอยู่กับแหล่งสถานที่ปลูก สภาพภูมิอากาศ เนื่องด้วยเขตอำเภอหัวหินจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงเนื่องด้วยมีลักษณะภูมิประเทศติดทะเล ทำให้ปริมาณแร่ธาตุในดินมีความจำเพาะเจาะจง และจากการสำรวจพรรณไม้ในพื้นที่พบว่ามีติ้วเกลี้ยงขึ้นอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของติ้วเกลี้ยงที่ขึ้นอยู่ในบริเวณเขตอำเภอหัวหินจึงมีความน่าสนใจ และได้มีรายงานสารประกอบ xanthone จากกิ่งของติ้วเกลี้ยงในบริเวณเขตอำเภอหัวหินที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างทางเคมี และแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งที่ดี

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ xanthone นั้นมีมากมาย ไม่ว่าจะเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ หรือได้จากธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการทั่วไป เช่น DPPH assay ยังขาดข้อมูลในเชิงวิเคราะห์ของความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระกับโครงสร้างทางเคมี (Structure Activity Relationship) ของสารประกอบ xanthone การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า เช่น Cyclic Voltammetry จึงเริ่มมีการนำมาใช้ สารประกอบอินทรีย์ที่ถูกวัดกระบวนการ

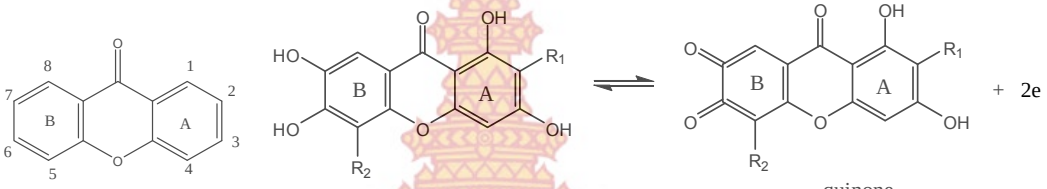
ออกซิเดชันและรีดักชันโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าสามารถเพิ่มความเข้าใจถึงกระบวนการที่สารเหล่านี้ถูกเมทาบอลิซึมในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ความรู้ด้านกลไกของปฏิกิริยาเหล่านี้มีความสำคัญในเทอมของการบ่งชี้สารระหว่างปฏิกิริยา (intermediate) ควรจะศึกษาเพิ่มเติมอย่างยิ่งเพื่อประยุกต์ใช้ในกระกวนการชลอความชราและการรักษาโรคต่างๆ อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้าของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของสารประกอบ xanthone บริสุทธิ์ ยังมีไม่มากนัก

ในปี 2005 Byong Won Lee และคณะ (Lee B. L.-T.-S., 2005) ได้ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของอนุพันธ์สารประกอบ xanthone 8 ตัว จากพืช Cudrania tricuspiddata และได้หาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทำลายอนุมูลอิสระ DPPH, superoxide, และ hydroxyl radical และได้เปรียบเทียบผลที่ได้กับเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ด้วยเทคนิค Cyclic Voltammetry (CV) ผลการศึกษาพบว่า สารประกอบ xanthone ที่มีหมู่ไฮดรอกซี (OH) บนวงอโรมาติก 2 หมู่ (เรียกว่า catecholic polyphenols) พบในสารประกอบ **3-8** จะแสดงความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (donating electrons) ที่ดี มีฤทธิ์ในการต้านอนูมูลอิสระที่ดีสามารถป้องกันการเกิดโรคได้โดยการกำจัด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์เสียหายหรือถูกทำลายอย่างถาวร (irreversible damage) กลุ่มสาร cathecholic จะสามารถถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่มี และไม่มีเอนไซม์ เกิดเป็นสารประกอบควิโนน (quinone) หรือ quinone-methide type prooxidant ซึ่งเชื่อว่าสามารถป้องกันโรคมะเร็งและกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ตัวอย่างของ catecholic polyphenols ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีในทาง phytochemical และมีการศึกษากันอย่างมากคือ quercetin, cetechin และ anthocyanidin



รูปที่ 4. โครงสร้างสารประกอบ xanthone ทั้ง 8 ตัว

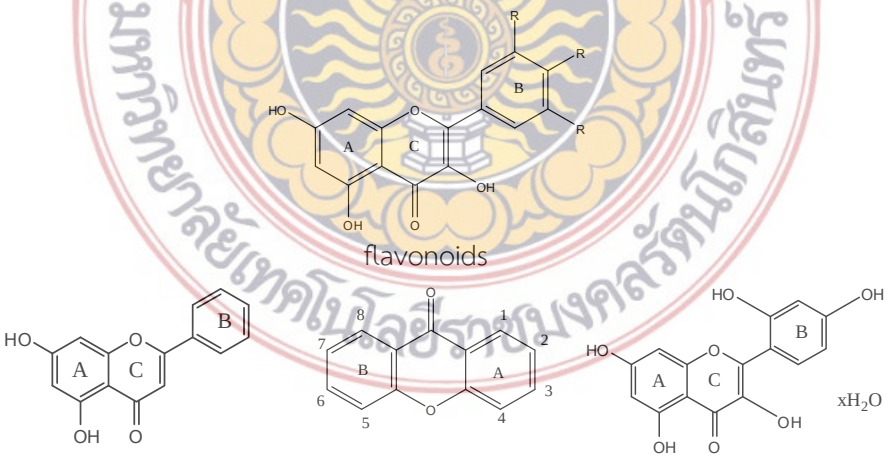
เมื่อทดสอบโดยใช้ DPPH Assay พบว่า สารประกอบ **3** และ **5-8** ที่มี 6,7-dihydroxy group ในวง B จะแสดง radical scavenging activities ที่แรง แต่สาร **4** ที่มี 5,6-dihydroxy group ในวง B จะแสดงฤทธิ์ที่ต่ำกว่า (ค่า IC_{50} สูงกว่า) ในขณะที่สารประกอบ **1** และ **2** ที่หมู่ catecholic hydroxyl ถูก protected ไว้ การต้านอนุมูลอิสระจะน้อย (IC_{50} > 200 μM) ซึ่งสามารถให้เหตุผลได้ว่า O-protected catechol ไม่สามารถเกิดกระบวนการถ่ายเทเพื่อที่จะเกิดเป็น quinone ได้ ในขณะที่ vicinal dihydroxyl group สามารถเกิดกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน 2 อิเล็กตรอนเพื่อเกิดเป็น quinone ได้ง่าย



xanthone

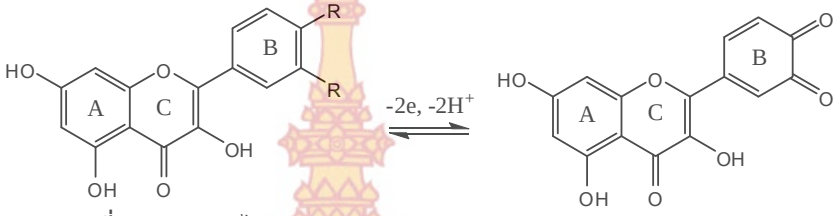
รูปที่ 5. แสดงกลไกการเปลี่ยนเป็นสารประกอบควิโนน (quinone) จากสารประกอบ xanthone

ในปี 2011 Anna Masek และคณะ (Masek, 2011) ได้ศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารประกอบสังเคราะห์ 8 ชนิดประกอบด้วย xanthone และ flavonoid (Quercetin, Morin hydrate, Chysin, Rutin hydrate, Hesperidin, และ flavone) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ flavonoids ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติเช่น ผัก ผลไม้ จะมีการรับอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอื่นได้สูง แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารเหล่านี้ ซึ่งสมควรนำมาใช้ในเป็นสารชลอความชรา (anti-ageing substances)



รูปที่ 6. แสดงโครงสร้างของสารประกอบต่างๆ (Masek, 2011)

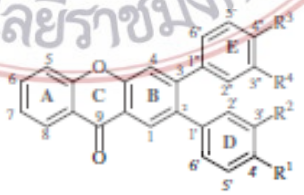
จากการศึกษาโดยเทคนิค CV พบว่าถ้าสารมีหมู่ไฮดรอกซี (OH) ในวงอโรมาติก A, B หรือ C การออกซิเดชันพีคแรกเป็นของวง B ซึ่งสอดคล้องการถ่ายโอนอิเล็กตรอน 1 หรือ 2 ตัวจะขึ้นอยู่กับจำนวน hydroxyl group ในวง B ส่วนพีคที่สองเป็นของวง A และC ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ที่ศักย์ไฟฟ้าสูงกว่า มีแค่ฟลาโวน (flavone) ที่มีให้ voltammogram ที่แสดงลักษณะของพีคแบบ reversible ส่วนสารอื่นๆ จะแสดงลักษณะของพีคแบบ irreversible



รูปที่ 7. แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร flavonoids

โวลแทมโมแกรมของฟลาโวนแสดง 2 พีค ส่วนของแซนโทนแสดง 3 พีค ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดปฏิกิริยาที่อิเล็กโทรดอย่างน้อยมี 2 ขั้น สารประกอบที่มีกลุ่มไฮดรอกซีในวง B 2 กลุ่มจะถูกออกซิไดซ์ง่ายกว่าสารอื่นๆ ที่มีหมู่ไฮดรอกซีเพียง 1 กลุ่ม สารประกอบ xanthone และ flavone จะถูกออกซิไดซ์ง่ายที่สุดและเร็วที่สุด ดูได้จากค่า E_{pa} (half-wave potential) ที่ต่ำ และค่า k (rate constant) ที่สูง แต่เมื่อจำนวนของหมู่ไฮดรอกซีเพิ่มขึ้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันก็จะช้าลง ดังที่เห็นใน quercetin

ในปี 2013 Clementina M. M. Santos และคณะ (Lee B. S., 2013) ได้ศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารประกอบ hydroxyxanthones โดยเทคนิค CV และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ (scavenging activities) ของ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบที่มีกลุ่ม catechol จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายกว่า (ให้พีคของการออกซิเดชันที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำกว่า) เมื่อเทียบกับสารประกอบฟีนอล (phenol) ทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารประกอบ xanthone ที่ประกอบด้วยกลุ่ม catechol 2 กลุ่ม จะให้ออกซิเดชันพีคต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทำลายอนุมูลอิสระของ ROS และ RNS ซึ่งให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด



รูปที่ 8. โครงสร้างทางเคมีของ hydroxyxanthones ที่ศึกษาโดย Clementina

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาข้างต้น พบว่าโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ xanthone นั้นมีความสัมพันธ์กัน โดยจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีเป็นปัจจัยสำคัญต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจจะศึกษาความสัมพันธ์ทางโครงสร้างและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป โดยใช้ความหลายหลายทางโครงสร้างของสารประกอบ xanthone ที่แยกได้จากติ้วเกลี้ยง ที่เก็บได้บริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างของติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) ส่วนกิ่ง เก็บที่บริเวณหลังมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล (เขต 4) ที่พิกัด ละติจูด 12° 28′39.599 ลองติจูด 99° 57′34.200 สำหรับส่วนกิ่งของติ้วขน เก็บที่อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ตัวอย่างเก็บในเดือนธันวาคม 2556 ได้ทำการเปรียบเทียบและพิสูจน์พันธุ์ไม้เปรียบเทียบที่สำนักหอพรรณไม้ กรมป่าไม้ ตัวอย่างพืชอัดแห้งได้ทำการเก็บรักษาที่หมวดวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวลตัวอย่าง Plant-004 และ Plant-005 ตามลำดับ

3.2 เครื่องมือและสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) Column OD 30 mm length 40 cm
2) Column OD 15 mm length 40 cm
3) NMR 400 MHz Bruker Avance 400
4) Varian Cary 50 Probe UV-visible spectrophotometer
5) NMR sample tube 5 ml
6) TLC Aluminum sheet
7) HRESIMS Bruker micrOTOF
8) Perkin-Elmer 1760X FTIR
9) Perkin-Elmer 341 polarimeter at 589 nm
10) Fisher-Johns melting point apparatus
11) μ-AUTOLAB TYPE III potentiostat (Cyclic Voltammetry)
12) Glassy carbon electrode
13) Pt wire
14) Silver wire

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) Silica gel for packed column No. 107734

2) Silica gel for packed column No. 109385

3) Ethyl acetate (EtOAc)

4) Methanol (MeOH)

5) Acetone

6) Dichloromethane (CH_2Cl_2)

7) Hexanes

8) Deuterated Chloroform ($CDCl_3$)

9) Dimethyl Sulfoxide-D6 (D, 99.99%)

10) DPPH

11) Tetrabutylammonium Hexafluorophosphate ($TBAPF_6$)

12) Silver Nitrate ($AgNO_3$)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยง (*C. cochinchinense*)

การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยงได้นำสารที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้จากงานวิจัยเรื่อง “สารสกัดจากติ้วเกลี้ยงที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง” ประจำปีงบประมาณ 2557 โดยสารบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ได้แก่ Dulcisxanthone B (**1**), β-mangostin (**2**), 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-(3-methylbut-2-eyl)-xanthone (**3**), cochinchinone A (**5**), 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (**6**),

3.3.2 การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากติ้วขน (*C. formasum*)

นำกิ่งของติ้วขนที่จากแห้งจำนวน 1.5 กิโลกรัม แช่ด้วยเฮกเซน จำนวน 15.0 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง และนำกากที่สกัดด้วยเอกเซนแล้วแช่ด้วยเมทานอลจำนวน 15.0 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง นำสารละลายเมทานอลที่ได้รวมกันและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเทคนิดลดความดัน นำสารสกัดเมทานอลเข้มข้นสกัดด้วยน้ำและเอทิลอะซิเทต จำนวน 0.5 ลิตร 3 ครั้ง รวมสารละลายที่ได้และระเหยด้วยเทคนิคลดความดัน ได้สารสกัดหยาบจำนวน 25.82 กรัม นำสารสกัดหยาบคลุกกับซิลิกาเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิดคอลัมน์โครมาโทรกราฟี เท silica gel ที่คลุกสารสกัดหยาบ EtOAc ไว้ลงบน silica gel ที่อิ่มตัวด้วย Hexane และเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายโดยเริ่มจาก 10-100% EtOAc/Hexanes ใช้เทคนิค TLC ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเพื่อ

รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกัน ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (F1-F4) นำส่วนสกัดย่อย F4 (1.21 กรัม) ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายโดยเริ่มจาก 30% Acetone/Hexanes ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 8 ส่วนสกัดย่อย (F4.1-F4.8) ส่วนสกัดย่อยที่ F4.1 จำนวน 175 mg เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทรกราฟีโดยใช้ตัวชะคือ CH_2Cl_2/Hexanes (1:1) พบสารบริสุทธิ์จำนวน 2 ชนิดคือ β-mangostin (**2**) และ cochinchinone A (**5**) ส่วนสกัดย่อยที่ F4.5 จำนวน 150 mg เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทรกราฟีโดยใช้ตัวชะคือ Acetone/Hexanes (1:3) พบสารบริสุทธิ์จำนวน 1 ชนิดคือ cochinchinone B (**7**) นำสารสกัดส่วนสกัดย่อยที่ F4.8 ที่เหลือจำนวน 150 mg ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีโดยใช้ตัวชะ Acetone/Hexanes (3:7) สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด Cudratricusxanthone E (**4**) สารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ตรวจสอบวิเคราะห์โครงสร้างทั้งหมดโดยใช้เทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) 400 MHz Bruker Avance 400 โดยใช้ DMSO-d_6 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิค ^{1}H, ^{13}C, COSY, HSQC, และ HMBC เปรียบเทียบข้อมูลทั้งหมดที่วิคราะห์ได้กับฐานข้อมูลงานวิจัย (Scifinder)

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์โดยวิธี DPPH

ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้คือ นำสารละลายของ DPPH (3.9 ml, 25 mg/L) ที่ละลายในเมทานอล มาผสมกับสารละลายของสารตัวอย่าง (0.1 mL) ทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา หรือจนกระทั่งสีของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ จากนั้นคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ก่อนใส่สารตัวอย่าง ดังนี้

$$\%DPPH_{REM} = 100 \times [DPPH]_{REM}/[DPPH]_{T=0}$$

ร้อยละของ DPPH ที่เหลืออยู่ ($\%DPPH_{REM}$) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลงลง 50% จะถูกกำหนดเป็น EC_{50} ตัวบ่งชี้อื่นๆ เช่น TC_{50} คือเวลาที่ใช้ในการเข้าสู่ steady state กับ EC_{50} และพฤติกรรมทางจลนศาสตร์ แสดงโดยตัวบ่งชี้ที่เรียกว่า “antiradical efficiency (AE)” หาได้จาก

$$AE = 1/ EC_{50}\ TC_{50}$$

3.3.4 การศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารบริสุทธิ์โดยเทคนิค Cyclic Voltammetry

3.3.4.1 การเตรียมสารในการทดลอง

1) สารละลาย Tetrabutylammonium Hexafluorophosphate ($TBAPF_6$) เข้มข้น 0.1 M ใช้เป็น supporting electrolyte

2) สารละลาย Silver Nitrate ($AgNO_3$) เข้มข้น 0.01 M

3) ขั้ว glassy carbon เป็นขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode)

4) Pt wire ใช้เป็นขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode)

5) ขั้วไฟฟ้า Ag-$AgNO_3$ (สร้างขึ้นจากการจุ่มแท่งซิลเวอร์ลงในสารละลาย $AgNO_3$ เข้มข้น 0.01 M ที่มี 0.1 M $TBAPF_6$ เป็นตัวทำละลาย) ใช้เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode)

6) สารละลายของสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.001 M ที่ละลายด้วยสารละลายของ $TBAPF_6$

7) สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.05 M ใช้เป็นสารละลายในการ sonicate

3.3.4.2 วิธีการทดลองเทคนิค CV

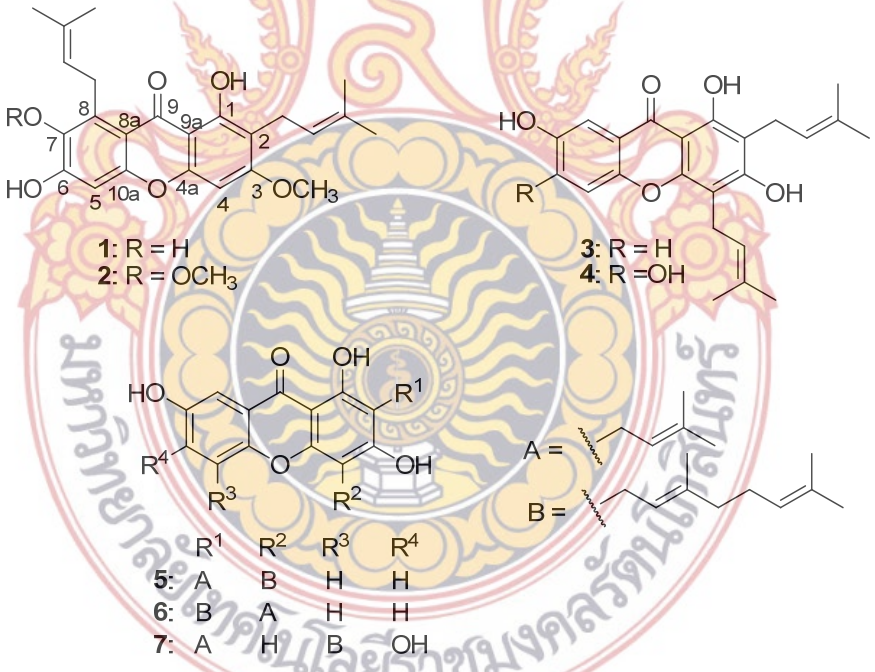
นำขั้ว glassy carbon มาขัดด้วยผง alumina ชุ่มน้ำที่มีขนาดอนุภาค 1.0 μm และ 0.3 μm จากนั้นล้างด้วยน้ำ จากนั้นกำจัดผง alumina ที่ยังหลงเหลือติดอยู่บนขั้วโดยการจุ่มในบีกเกอร์ที่มีสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.05 M และนำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำขั้ว glassy carbon มาล้างด้วยอะซีโตน และเป่าให้แห้ง จะได้ขั้ว glassy carbon ที่มีผิวหน้ามันวาว ไม่มีอนุภาคใดๆ ติดอยู่ จากนั้นเทสารละลายของสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยงลงในเซลล์เสียบขั้วไฟฟ้าทั้ง 3 ขั้วให้จุ่มในสารละลาย ประกอบด้วย ขั้ว glassy carbon, Pt wire, และขั้วไฟฟ้า Ag-$AgNO_3$ โดยตรวจสอบดูว่าไม่มีฟองอากาศอยู่บริเวณผิวหน้าของขั้วไฟฟ้า Ag-$AgNO_3$ จากนั้นเป่าแก๊สไนโตรเจนเข้าไปในสารละลายเป็นเวลา 5 นาทีก่อนทำการทดลอง จากนั้นจึงเริ่มทดลองได้

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยง (*C. cochinchinense*) และติ้วขน (*C. formasum*)

จากการแยกสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยง (*C. cochinchinense*) และติ้วขน (*C. formasum*) โดยเทคนิคทางโครมาโทรกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 7 ชนิดคือ Dulcisxanthone B (**1**), β-mangostin (**2**), 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-(3-methylbut-2-eyl)-xanthone (**3**), Cudratricusxanthone E (**4**), cochinchinone A (**5**), 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (**6**), and cochinchinone B (**7**) โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนผลแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9. โครงสร้างสารบริสุทธิ์จากติ้วเกลี้ยง (*C. cochinchinense*) ติ้วขน (*C. formosum*)

4.2 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มแซนโทนทั้ง 7 ชนิด โดยอาศัยวิธี DPPH ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของสาร **1-7** ตั้งแต่ 10, 20, 30, 40 และ 50 μM และ 1, 5, 10, 15, และ 20 μM ในกรณีที่สารสามารถยับยั้งการดูดกลืนแสงของ DPPH ได้ดี ผสมกับสารละลายของ DPPH โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล จากนั้นทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงมาของ DPPH มาคำนวณร้อยละของ DPPH ที่เหลืออยู่ ($\%DPPH_{REM}$) หรือ %inhibition โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

$$\%DPPH_{REM} = 100 \times [DPPH]_{REM}/[DPPH]_{T=0}$$

ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และ %inhibition ของสาร **1-7** แสดงดังตารางที่ 1-7

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร **1**

สาร	Conc (uM)	Absorbance	%inhibition
1	10.00	0.3968	7.977736549
1	20.00	0.3666	14.98144712
1	30.00	0.3480	19.29499072
1	40.00	0.3287	23.77087199
1	50.00	0.32	25.78849722
DPPH		0.4312	

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร **2**

สาร	Conc (uM)	Absorbance	%inhibition
2	1.00	0.6393	5.232730507
2	5.00	0.5467	18.95938334
2	10.00	0.4338	35.6952268
2	15.00	0.341	49.45152683
2	20.00	0.238	64.71983398
DPPH		0.6746	

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร **3**

สาร	Conc (uM)	Absorbance	%inhibition
3	10.00	0.4176	3.153988868
3	20.00	0.4022	6.72541744
3	30.00	0.3962	8.116883117
3	40.00	0.3791	12.0825603
3	50.00	0.3508	18.64564007
DPPH		0.4312	

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร **4**

สาร	Conc (uM)	Absorbance	%inhibition
4	10.00	0.4764	-10.48237477
4	20.00	0.4474	-3.756957328
4	30.00	0.4294	0.417439703
4	40.00	0.3931	8.83580705
4	50.00	0.4136	4.081632653
DPPH		0.4312	

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร **5**

สาร	Conc (uM)	Absorbance	%inhibition
5	1.00	0.6297	6.655796027
5	5.00	0.5546	17.788319
5	10.00	0.4124	38.86747702
5	15.00	0.2946	56.32967685
5	20.00	0.2181	67.66973021
DPPH		0.6746	

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร **6**

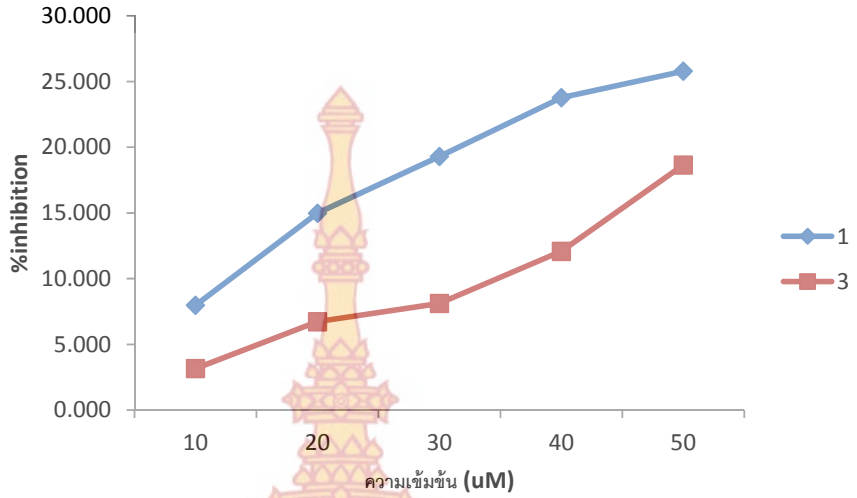
สาร	Conc (uM)	Absorbance	%inhibition
6	1.00	0.6184	8.330862733
6	5.00	0.458	32.1079158
6	10.00	0.2702	59.94663504
6	15.00	0.1549	77.03824489
6	20.00	0.0861	87.23688111
DPPH		0.6746	

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของสาร **7**

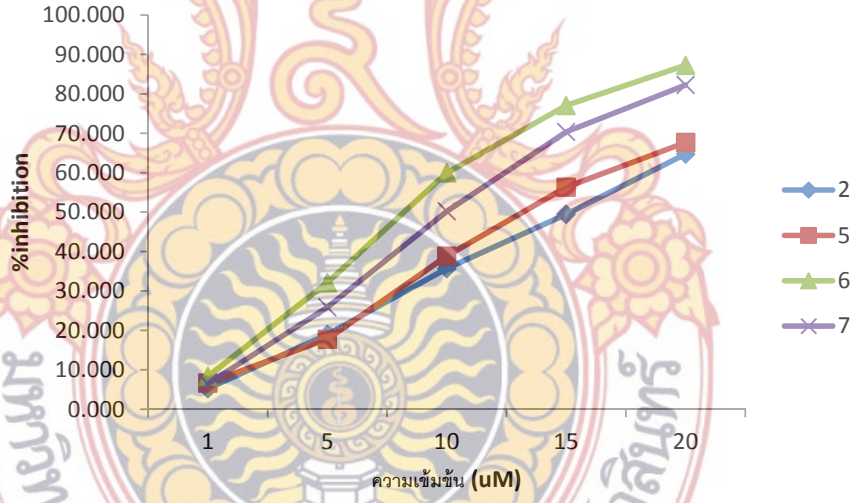
สาร	Absorbance	Conc (uM)	%inhibition
7	0.6307	1.00	6.507560036
7	0.5001	5.00	25.86718055
7	0.3358	10.00	50.22235399
7	0.2001	15.00	70.33797806
7	0.1197	20.00	82.25615179
DPPH	0.6746		

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance) และ %inhibition ของ trolox

สาร	Absorbance	Conc (uM)	%inhibition
trolox	0.6499	1.00	3.661428995
trolox	0.2573	20.00	61.85887934
trolox	0.0278	40.00	95.87903943
DPPH	0.6746		



รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสาร **1** และ **3**



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสาร **2, 5, 6** และ **7**

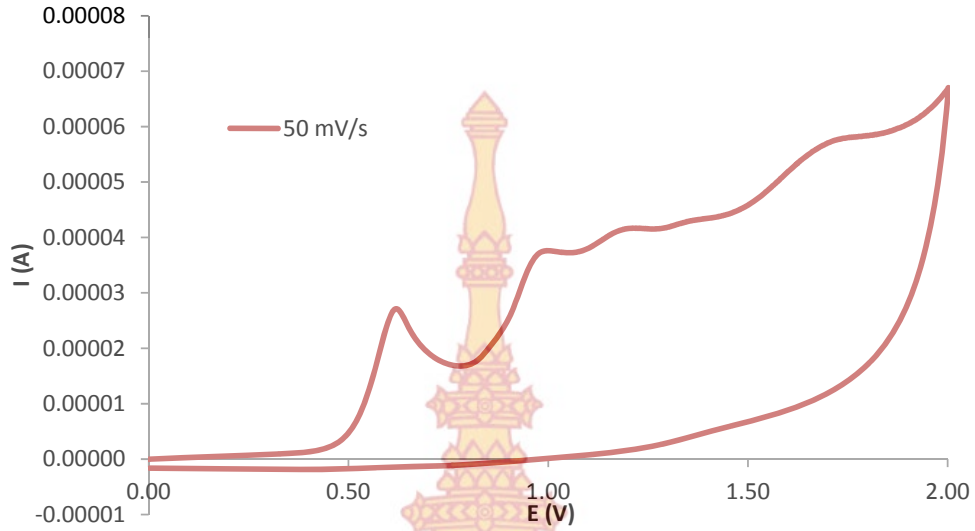
การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มแซนโทนทั้ง 7 ชนิด โดยอาศัย**วิธี** DPPH ได้ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งในการเกิดอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) แสดง**ใน**ตารางที่ 9 โดยใช้สารมาตรฐานคือ Trolox ในการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นของสาร **1-7** ที่สามารถยับยั้งในการเกิดอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

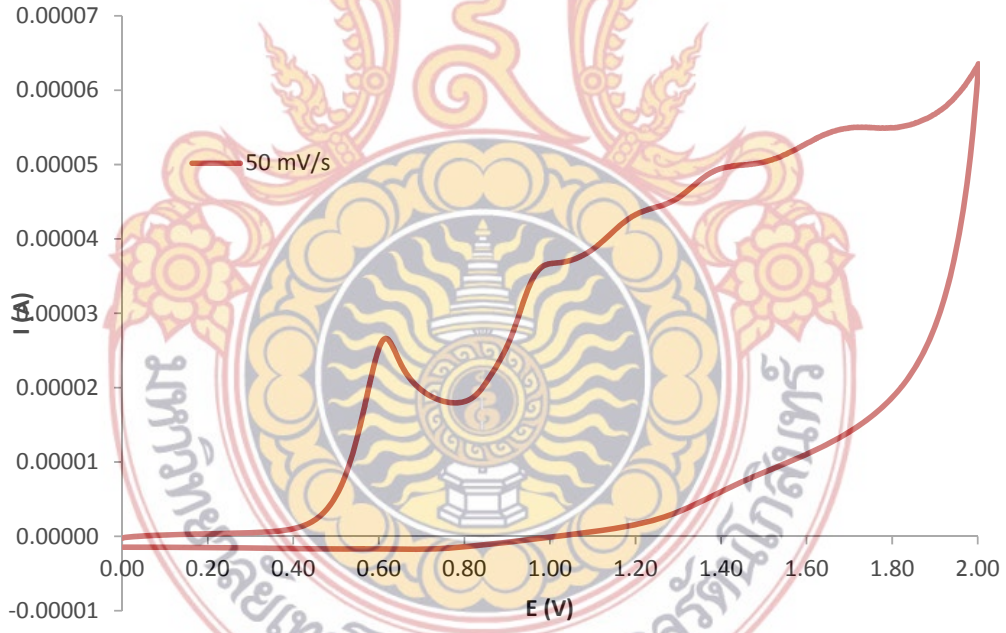
Compounds	DPPH radical scavenging (IC_{50}, μM)
1	13.95
2	15.08
3	89.41
4	9.50
5	101.24
6	134.41
7	10.93
Trolox	18.72

4.3 การศึกษาด้วยเทคนิคเคมีไฟฟ้า

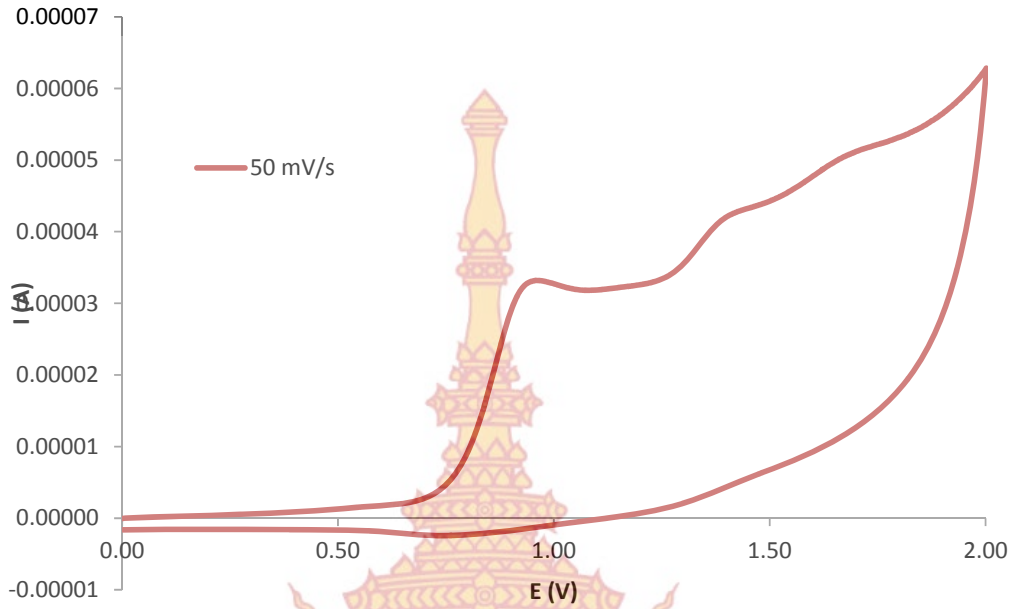
ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารประกอบแซนโทนทั้ง 7 ตัว โดยใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมททรี (Cyclic Voltammetry, CV) ซึ่งประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ประกอบด้วย ขั้ว glassy carbon, Pt wire, และขั้วไฟฟ้า Ag-$AgNO_3$ โดยสภาวะในการทดลองใช้ 0.1 M ของ $TBAPF_6$ ที่ละลายอยู่ใน 10%CH_3CN/CH_2Cl_2 เป็น supporting electrolyte ใช้ในการละลายสารประกอบแซนโทน และใช้ละลาย $AgNO_3$ ซึ่งใช้แช่ขั้ว Ag ทำหน้าที่เป็นขั้วไฟฟ้าอ้างอิง และใช้ glassy carbon เป็นขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) สารละลายของสารประกอบแซนโทนจะถูกเป่าแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 3 นาที ก่อนทำการวัดในแต่ละครั้ง



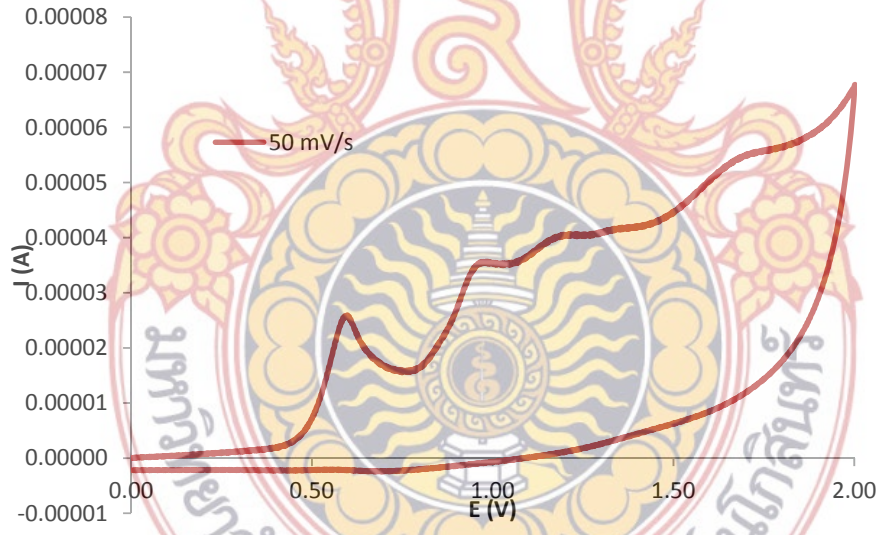
รูปที่ 12. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **1** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s



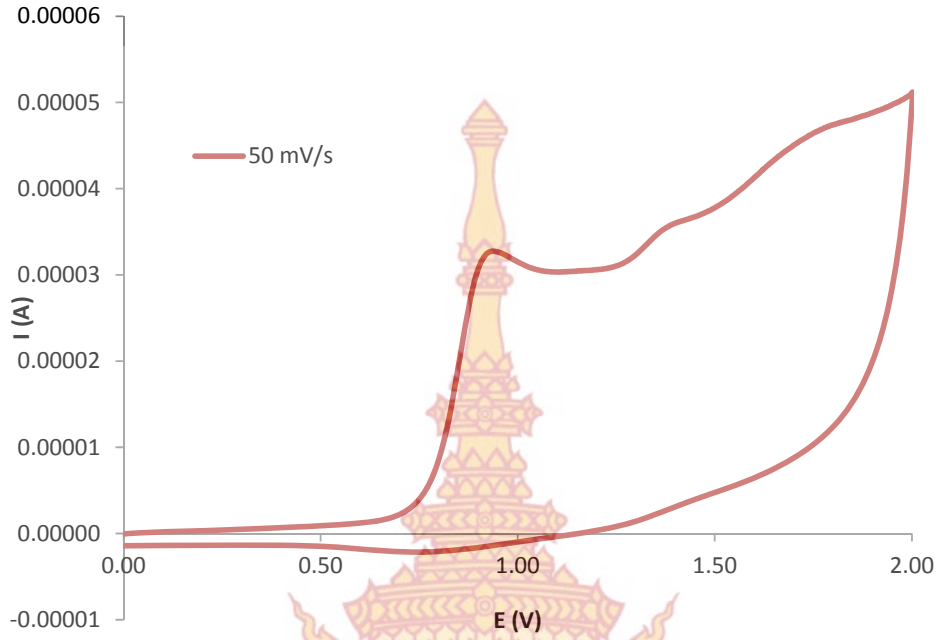
รูปที่ 13. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **2** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s



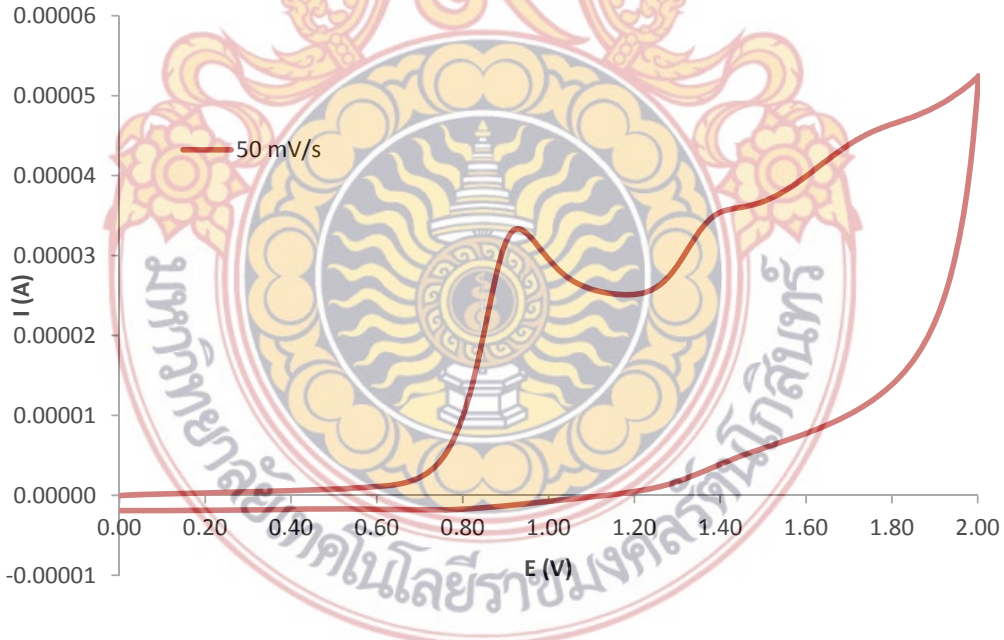
รูปที่ 14. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **3** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s



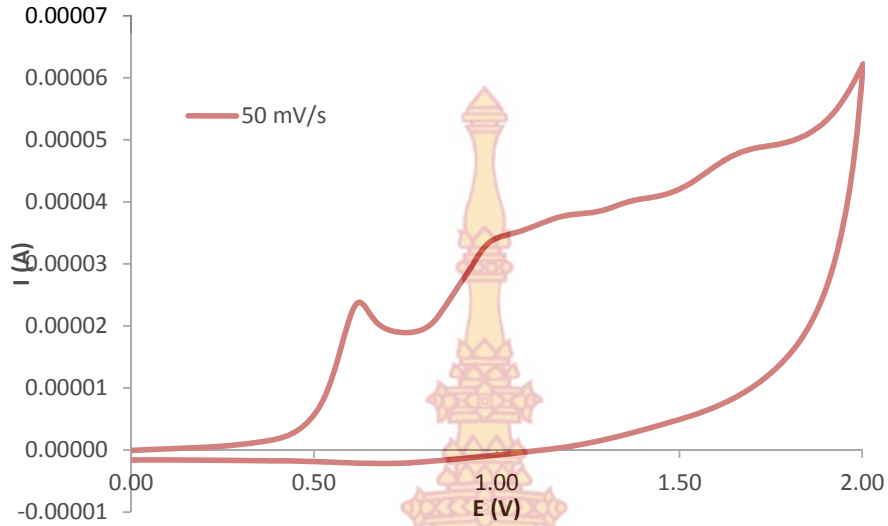
รูปที่ 15. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **4** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s



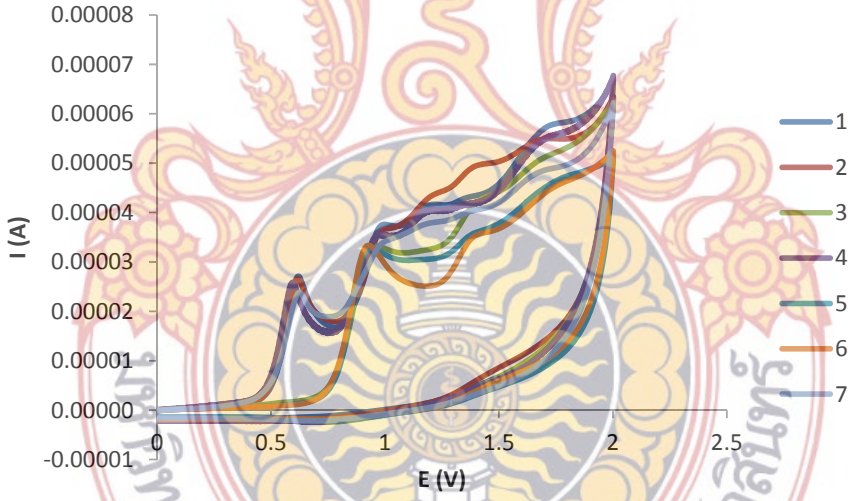
รูปที่ 16. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **5** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s



รูปที่ 17 Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **6** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 100 mV/s



รูปที่ 18 Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **7** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 100 mV/s

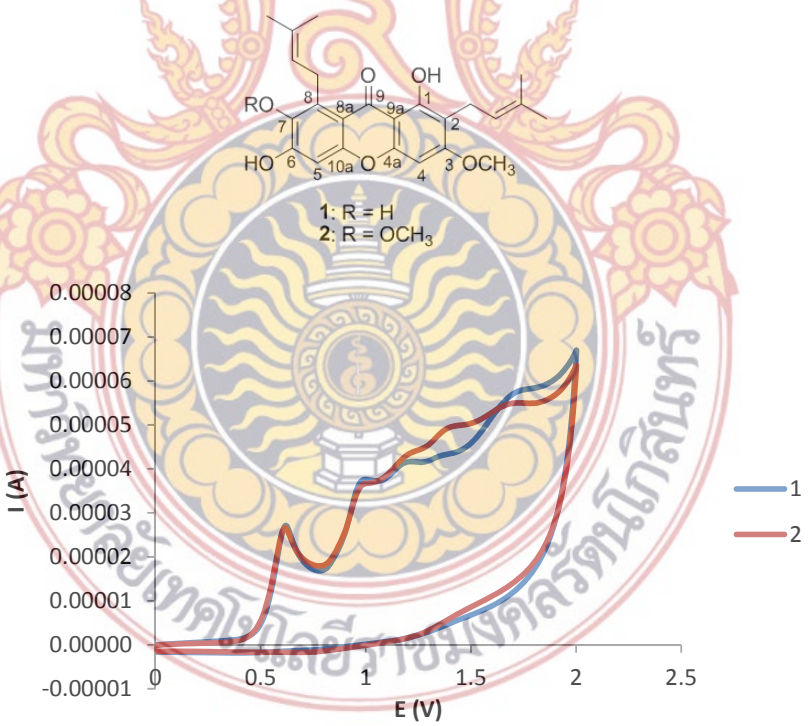


รูปที่ 19. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **1-7** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s

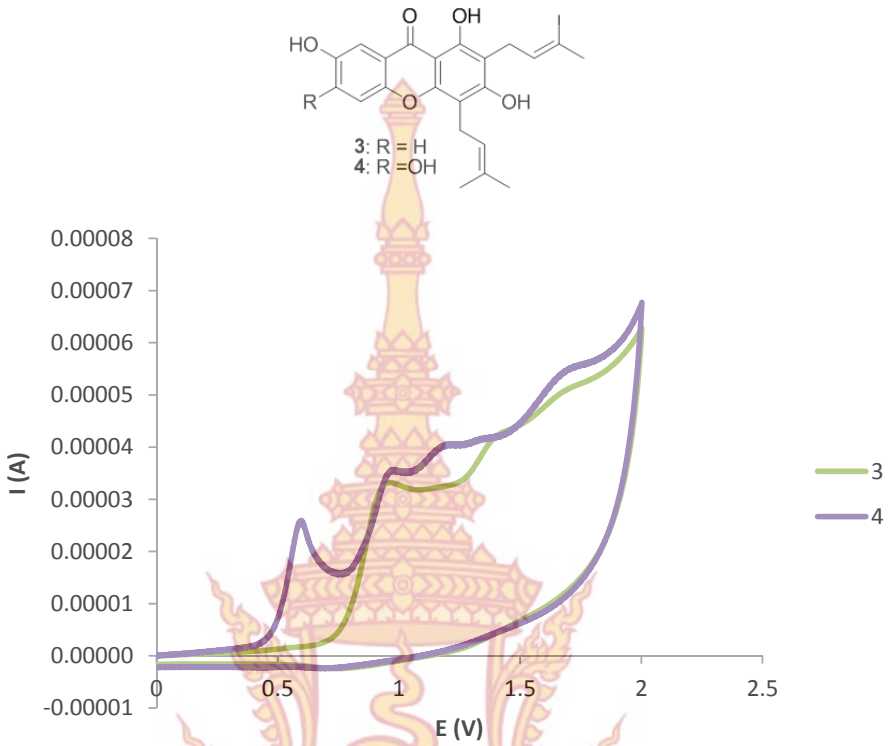
ตารางที่ 10 ค่าศักย์ไฟฟ้าของการออกซิเดชัน (E) ของสาร **1-7**

สาร	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
1	0.60	0.97	1.15	1.34	1.68
2	0.60	0.96	1.18	1.36	1.66
3	0.92			1.37	
4	0.58	0.94	1.15	1.31	1.65
5	0.91			1.36	
6	0.90			1.37	
7	0.62	0.97	1.13	1.35	1.62

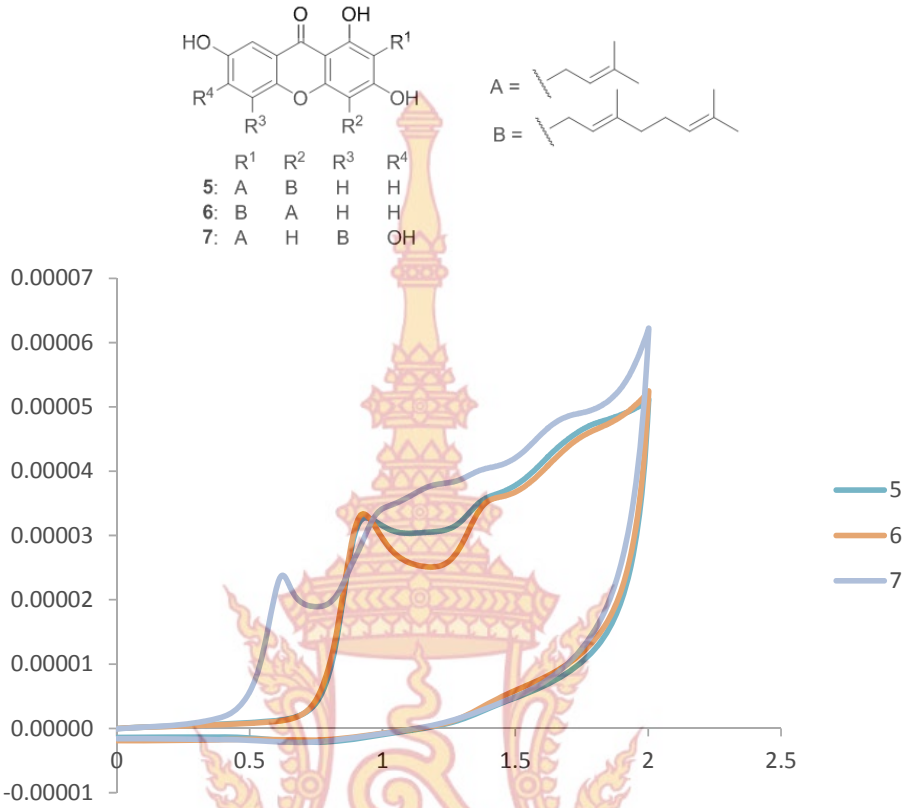
เปรียบเทียบให้เห็นความคล้ายคลึง หรือแตกต่างของพฤติกรรมทางเคมีไฟฟ้าของสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันดังนี้



รูปที่ 20 โครงสร้าง และ Cyclic voltammograms ของสาร **1** และ **2** ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s



รูปที่ 21 โครงสร้าง และ Cyclic voltammograms ของสาร **3** และ **4** ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s



รูปที่ 22 โครงสร้าง และ Cyclic voltammograms ของสาร **5, 6** และ **7** ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$, scan rate 50 mV/s

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการแยกสารกลุ่มแซนโทนจากติ้วเกลี้ยง (C. cochinchinense) และติ้วขน (C. formasum) ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 7 ชนิดคือ Dulcisxanthone B (**1**), β-mangostin (**2**), 1,3,7-trihydroxy-2,4-di-(3-methylbut-2-eyl)-xanthone (**3**), Cudratricusxanthone E (**4**), cochinchinone A (**5**), 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone (**6**), and cochinchinone B (**7**) โดยสารทั้งหมดได้แบ่งกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างได้ดังนี้ กลุ่ม β-mangostin (**1-2**) กลุ่ม 1,3,7-trihydroxy (**3-7**) และได้นำสารทั้งหมดทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ Cudratricusxanthone E (**4**) ที่ระดับ IC_{50} 9.50 μM ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐานประมาณ 2 เท่า และสารกลุ่มแซนโทนที่มีโครงสร้างแตกต่างออกไปจะมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เท่ากัน จากการศึกษาสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของสารกลุ่มแซนโทนที่แยกได้ พบว่าสารมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีจะแสดงคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย เช่นเดียวกันโดยที่ scan rate มีผลน้อยมากต่อการเกิดปฏิกริยาของสารกลุ่มนี้

5.2 อภิปรายผล

จากผลการทดลองสารกลุ่มแซนโทนที่มีหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง 6 และ 7 จะแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Cudratricusxanthone E (**4**) และ cochinchinone B (**7**) ซึ่งมีหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 6 และ 7 จะมีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ระดับ IC_{50} เท่ากับ 9.50 และ 10.93 μM ในขณะเดียวกัน สารกลุ่มแซนโทนที่มีหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 6 จะแสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ดีเช่นเดียวกันเช่น Dulcisxanthone B (**1**) และ β-mangostin (**2**) จะมีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ระดับ IC_{50} เท่ากับ 13.95 และ 15.08 μM สำหรับสารที่มีหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 7 จะแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าสารที่มีหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 6 (IC_{50} > 80 μM) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าหมู่ hydroxyl ที่อยู่บนตำแหน่งที่ 6 เป็นกลไกสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารกลุ่มแซนโทน ซึ่งสมมติฐานนี้มีการสนับสนุนจากผลของเคมีไฟฟ้าของสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่ทดสอบ โดยสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายในทางเคมีไฟฟ้า

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองของการหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และการศึกษาผลทางเคมีไฟฟ้าจะเห็นได้ว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยมีค่า IC_{50} ที่ต่ำนั้น จะสามารถเห็นสัญญาณที่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำของเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีด้วยเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากโครงสร้างของแซนโทนที่นำมาศึกษาในงานวิจัยชิ้นนี้ยังมีความหลากหลายค่อนข้างน้อย ดังนั้นจึงควรหาตัวอย่างแซนโทนที่มีความหลากหลายมากขึ้น เพื่อศึกษาถึงเชิงลึกในการเกิดปฏิกริยากับอนุมูลอิสระ เพื่อที่จะพัฒนาสารกลุ่มแซนโทนให้สามารถประยุกต์ใช้ได้ในทางด้านอื่นต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

A., Zaborski, M., Chrzescijanska, E. Masek. (2011). Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. *Food Chem.*, 699-704.

A.R., Zuin, V.G., Cavalheiro, T.G., Mazo, L.H. Malagutti. (2006). Determination of rutin in green tea infusions using square-wave voltammetry with a rigid carbon-polyurethane composite electrode . *Electroanalysis*, 1028-1034.

B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M., Ames. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 7915-7922.

B.W., Lee, J.H., Lee, S.-T., Lee, H.S., Lee, W.S., Jeong, T.-S., Park, K.H. Lee. (2005). Antioxidant and cytotoxic activities of xanthones from Cudrania tricuspidata. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5548-5552.

B.W., Santos, C.M.M., Garcia, M.B.Q., Silva, A.M.S., Santus, R., Morliere, P., Frenandes, E. Lee. (2013). Electrochemical Characterization of bioactive hydroxyxanthones by cyclic voltammetry . *Tetrahedron Lett.*, 85-90.

C.M.M., Ribeiro, M.F.D., Gomes, A., Silva, A.M.S., Cavaleiro, J.A.S., Fernades, E. Santos. (2010). 2,3-Diarylxanthones as strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species: A structure-activity relationship study . *Bioorg. Med. Chem.*, 6776-6784.

D., Ou, B., Prior, R.L. Huang. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agri. Food Chem.*, 1841-1856.

J. Heinze. (1984). Cyclic voltammetry-“ Electrochemical Spectroscopy” . *Angew. Chem.*, 831-918.

M., Prenzler, P.D., Emilios, P., McDonald, S., Robards, K. Antolovich. (2002). Methods for testing antioxidant activity . *Analyst*, 183-198.

P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L. Kilmartin. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 1957-1965.

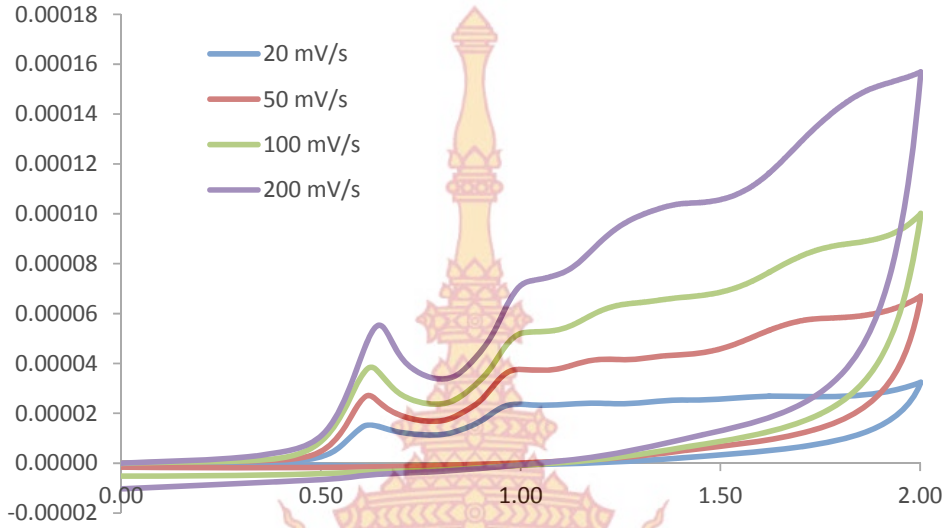
R.L., Wu, X., Schaich, K. Prior. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agri. Food Chem.*, 4290-4302.

เบญจมาส ไชยลาภ, ทรงจันทร์ ภู่ทอง, อนุมาศ บัวเขียว ธเนศวร นวลใย. (2558). “ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแซนโทนจากกิ่งของ Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง*, 1-12.

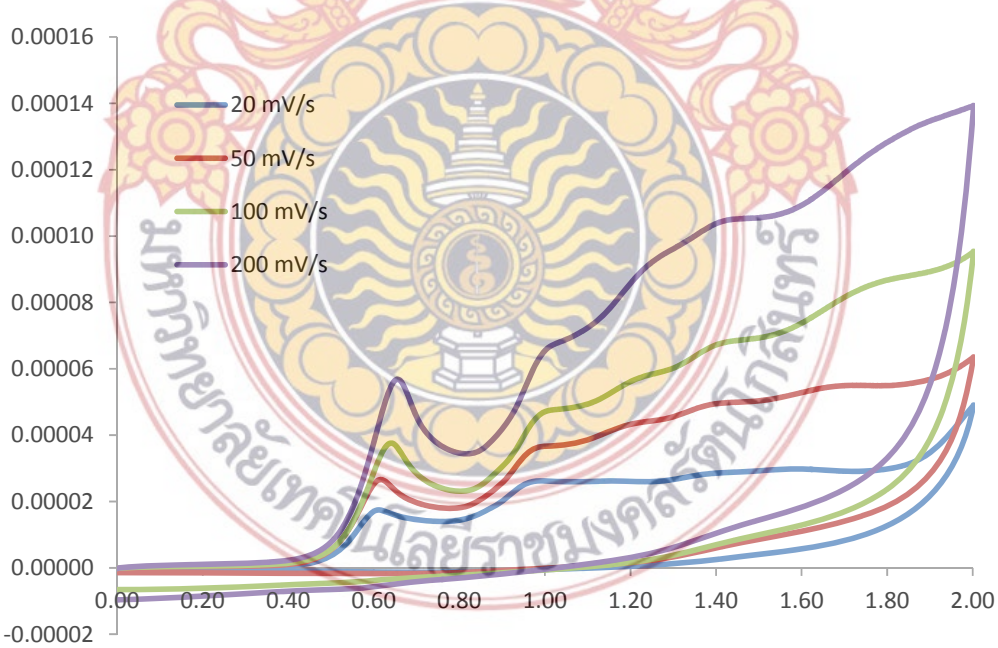
บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 275-286.

ภาคผนวก

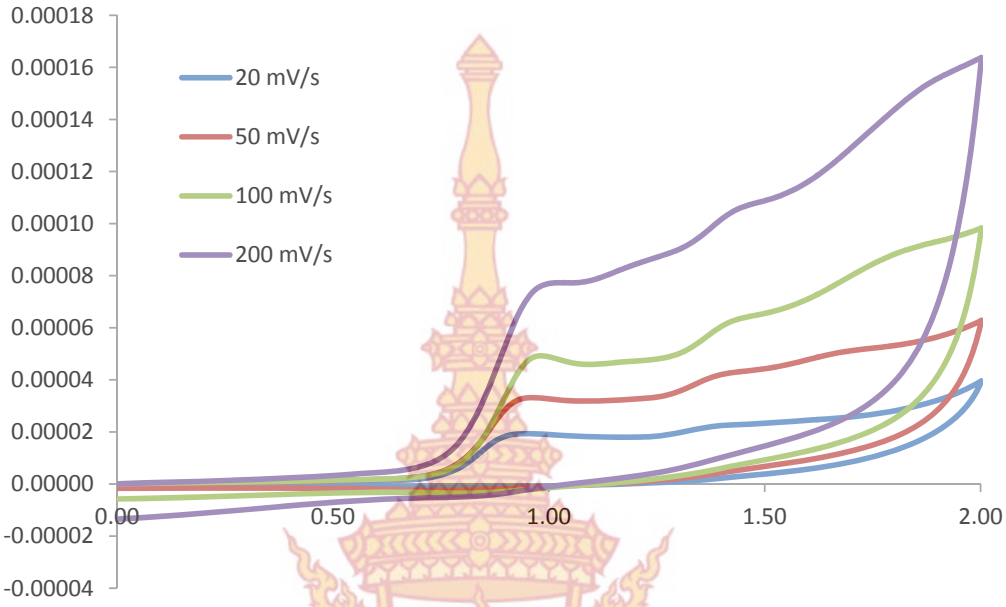
Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์



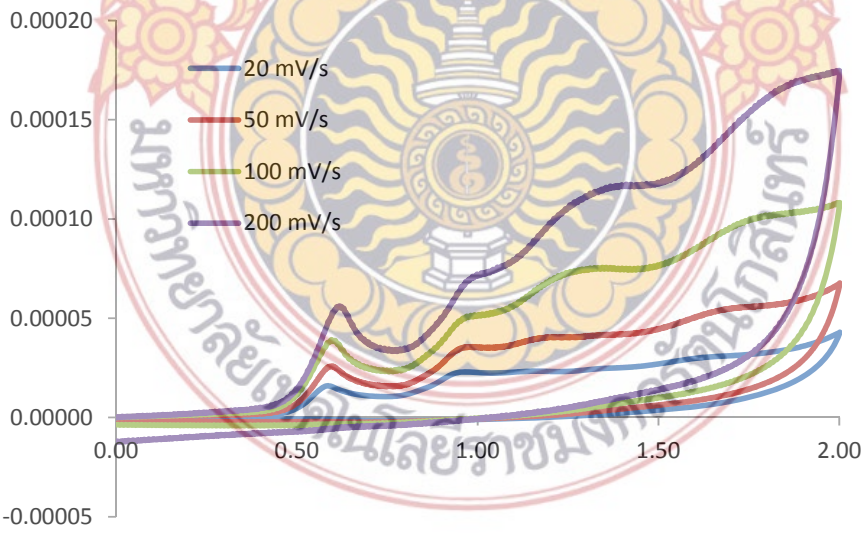
รูปที่ 11. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **1** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$



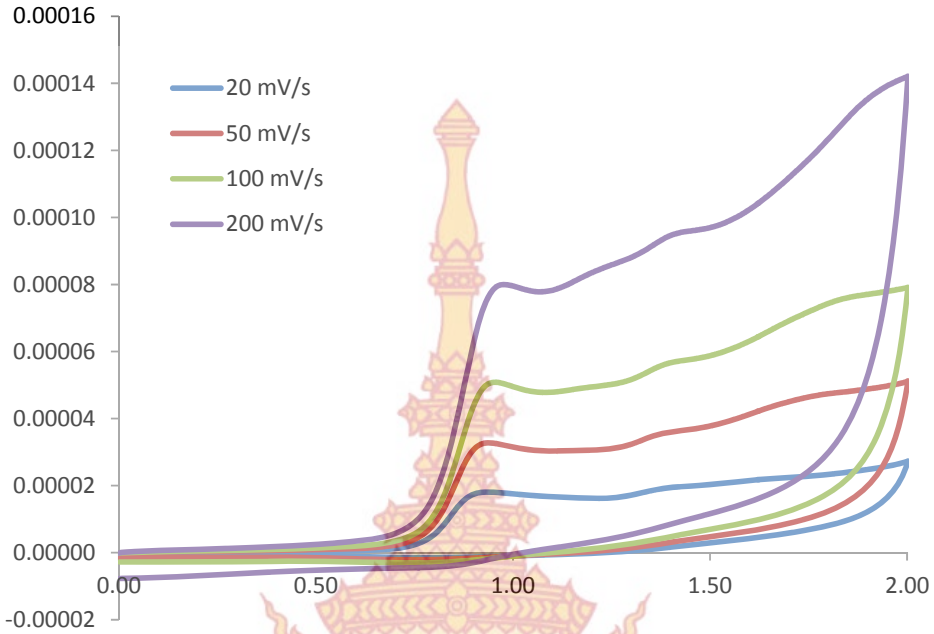
รูปที่ 12. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **2** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$



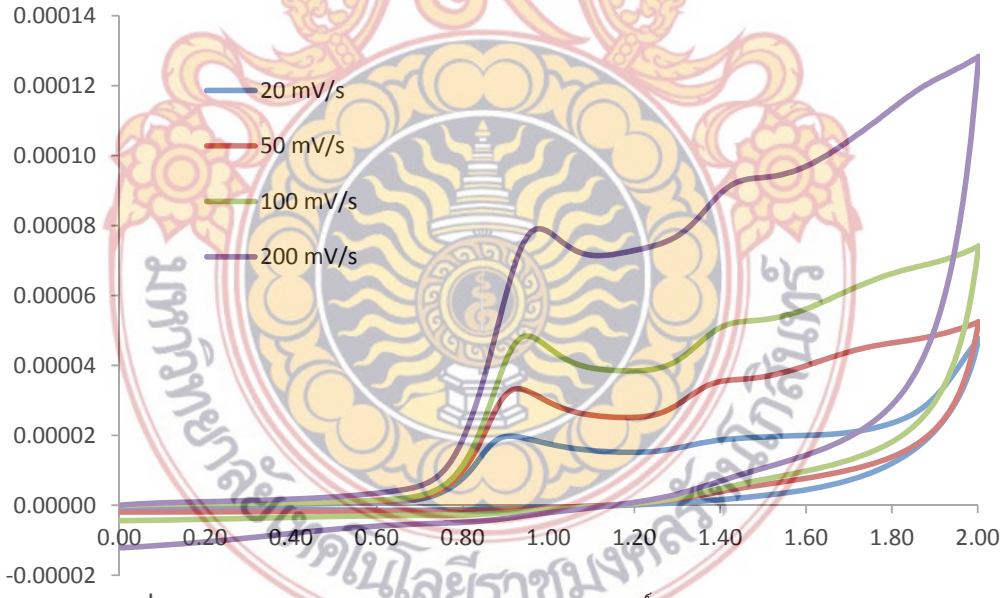
รูปที่ 13. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **3** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$



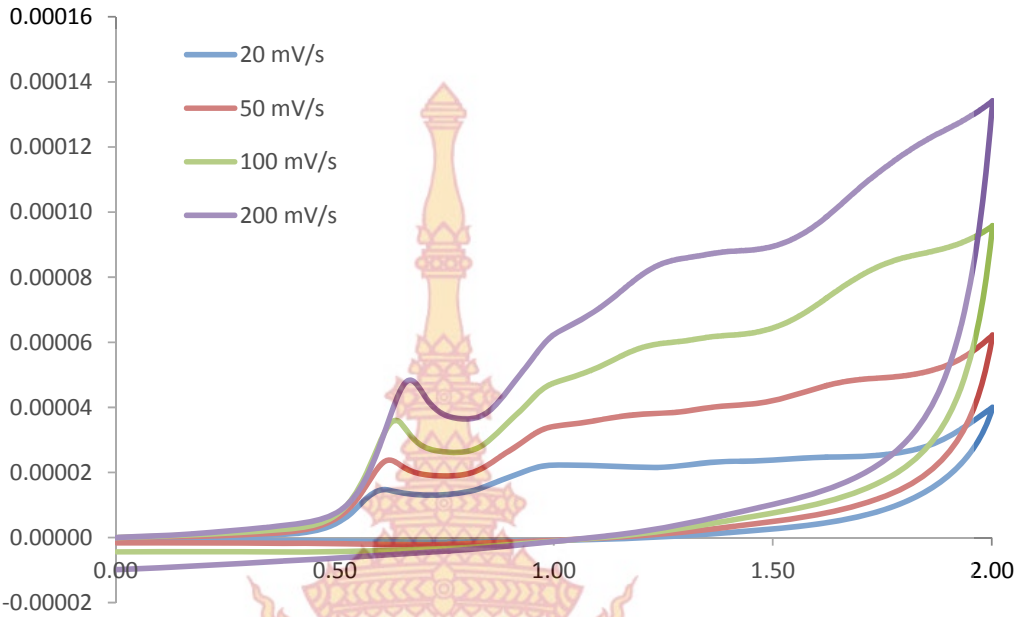
รูปที่ 14. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **4** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$



รูปที่ 15. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **5** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$



รูปที่ 16. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **6** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$



รูปที่ 17. Cyclic voltammograms ของสารบริสุทธิ์ **7** (1.0 mM) ในสารละลาย 10%CH_3CN/CH_2Cl_2, 0.1 M $TBAPF_6$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - สกุล ดร.เบญจมาส ไชยลาภ

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

3. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้

คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล ถนนเพชรเกษม ตำบลหนองแก อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77110

โทรศัพท์ 032-618-800 ต่อ 4805, โทรสาร 032-618-570,

โทรศัพท์มือถือ 089-659-5210,

e-mail: b_amat@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วท.ด.(เคมี) สาขาเคมีอินทรีย์, “2555”

ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วท.บ.(เคมี) สาขาเคมี, “2549”

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ การสังเคราะห์สาร และเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย -ไม่มี-