การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท จากหัวแก่นตะวัน

ชุติมา มัชฌเวทย์
นิโลบล ทีสุ่ม

การศึกษาอิสระ เสนอเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
เมษายน 2562
มหาวิทยาลัยพะเยา

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

คณะกรรมการสอบการศึกษาอิสระ อาจารย์ที่ปรึกษา และคณบดีคณะวิทยาศาสตร์ ได้พิจารณาการศึกษาเรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทจากหัวแก่นตะวัน" เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยพะเยา

.....

(ดร. ชัยพัฒน์ ลาพินี)

ประธานกรรมการ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัลยา จำปาทอง)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ นาสมใจ)

กรรมการ

.....

(รองศาสตราจารย์ปรียานันท์ แสนโภชน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

เมษายน 2562

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผศ.ดร. กัลยา จำปาทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ชี้แนะการศึกษาพร้อมทั้งให้ข้อมูลอีกทั้งยังได้รับคำแนะนำอันเป็นประโยชน์รวมถึงแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดขึ้น ด้วยความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการศึกษาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร.ชัยพัฒน์ ลาพินี และผศ.ดร.พิทักษ์ นาสมใจ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นคณะกรรมการสอบในครั้งนี้ พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และ ห้องปฏิบัติวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความร่วมมือและให้คำปรึกษา พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกในเรื่อง อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือต่างๆ สำหรับการทดลอง อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำจนการศึกษาอิสระเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาจนประสบ-ความสำเร็จ

ชุติมา มัชฌเวทย์

นิโลบล ทีสุ่ม

ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทจากหัวแก่นตะวัน

ผู้ศึกษาค้นคว้า นางสาวชุติมา มัชฌเวทย์
นางสาวนิโลบล ทีสุ่ม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัลยา จำปาทอง

คำสำคัญ หัวแก่นตะวัน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทจากหัวแก่นตะวัน สารสกัดถูกนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ABTS และ FRAP ปริมาณฟีนอลิกรวมถูกตรวจสอบโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปีโดยใช้ Folin–ciocalteu สารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 69.70 mg/L เมื่อทดสอบโดยวิธี DPPH ค่า TEAC เท่ากับ 5.0128 mM และค่า FRAP เท่ากับ 2.3331 mg Fe/g DW เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS และ FRAP ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบมีค่าเท่ากับ 0.8201 mg GAE/g DW

Title The study of antioxidant activity from ethyl acetate crude extract of *Helianthus tuberosus* L. rhizome

Author Miss.Chutima Matchavaj

Miss.Nilobon Teesoom

Advisor Asst. Prof. Kanlaya Jumpatong, Ph.D.

Bachelor of Science Program in Chemistry

Keywords *Helianthus tuberosus* L., Antioxidant activity

Abstract

This research aims to study the antioxidant activites and total phenolic content from *Helianthus tuberosus* L. rhizome extract. The material was extracted with ethyl acetate. This extract was evaluated with DPPH, ABTS and FRAP assays. Total phenolic content was determined using a spectrophotometric technique, base on Folin–ciocalteu reagent. The crude extract showed antioxidant activity with IC_{50} value of 69.70 mg/L in DPPH assay, TEAC and FRAP values of 5.0128 mM and 2.3331 mg Fe/g DW in ABTS and FRAP assays, respectivety. Total phenolic content of this crude extract was 0.8201 mg GAE/g DW.

สารบัญ

หน้า

หน้าอนุมัติ..... ก
กิตติกรรมประกาศ..... ข
บทคัดย่อ..... ค
ABSTRACT..... ง
สารบัญเรื่อง..... จ
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญภาพ..... ฎ
อักษรย่อ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย..... 3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา..... 4
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 4
1.6 แนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์..... 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หัวแก่นตะวัน..... 5
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร..... 9
2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืช..... 11
2.4 อนุมูลอิสระ..... 13
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ..... 17
2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม..... 19
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 25
3.2 วัสดุอุปกรณ์..... 26
3.3 เครื่องมือ..... 27
3.4 แผนการดำเนินการวิจัย..... 27
3.5 วัตถุดิบ..... 28
3.6 การเตรียมตัวอย่างหัวแก่นตะวัน..... 29
3.7 การสกัดสารสกัดหัวแก่นตะวันด้วยตัวทำละลาย..... 29
3.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH..... 29
3.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS..... 31
3.10 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 33
3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu..... 35
3.12 ข้อแนะนำ..... 38

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดหัวแก่นตะวันในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท..... 39
4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH..... 40
4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS..... 51
4.5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP..... 59
4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocateu..... 66
4.6 อภิปรายผล..... 73

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินวิจัย

5.1 สรุปผลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม..... 75

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 76

บรรณานุกรม..... 77

ประวัติผู้ศึกษาวิจัย..... 112

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก..... 81

ภาคผนวก ข..... 87

ภาคผนวก ค..... 93

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

1	อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง.....	16
2	แสดงผลน้ำหนักของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท...	39
3	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 1).....	41
4	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 2)	41
5	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 3)	42
6	แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซีที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด.....	42
7	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 1).....	44
8	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 2)	44
9	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 3)	45
10	แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานบีเอชเอที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด.....	45
11	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 1)	47
12	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 2)	47
13	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 3)	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
14	แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด.....	49
15	แสดงค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH.....	50
16	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 1).....	52
17	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 2).....	52
18	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 3).....	53
19	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 1).....	54
20	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 2).....	54
21	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอซีเตททำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 3).....	54
22	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 1).....	55
23	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 3)	55
24	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 4)	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
25	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 1).....	56
26	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 2)	56
27	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 3)	56
28	แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทลอกซ์ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท สารละลายวิตามินซี และสารละลายบีเอชเอ ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด	57
29	แสดงผลค่า TEAC ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS.....	58
30	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 1).....	60
31	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 2).....	60
32	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 3).....	61
33	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิล–อะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 1).....	62
34	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิล–อะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 2).....	62
35	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิล–อะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 3).....	62
36	แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu.....	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
37	แสดงผลค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin–Ciocalteu.....	65
38	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ทำปฏิกิริยาสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) ทีพีทีแซต (TPTZ) (ชุด 1).....	67
39	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ทำปฏิกิริยาสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) ทีพีทีแซต (TPTZ) (ชุด 2).....	67
40	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ทำปฏิกิริยาสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) ทีพีทีแซต (TPTZ) (ชุด 3)	68
41	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิล – อะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) (ชุด 1).....	69
42	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิล–อะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) (ชุด 2).....	69
43	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิล–อะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) (ชุด 3).....	69
44	แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตและสารสกัดรากแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP).....	70
45	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละช่วงเวลาที่ได้จากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี DPPH.....	72
ก1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี DPPH.....	80
ก2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละช่วงเวลาที่ได้จากการวิเคราะห์เวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี ABTS.....	82
ก3	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละช่วงเวลาที่ได้จากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยา Folin–Ciocateu.....	84

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	หัวแก่นตะวัน.....	5
2	ต้นแก่นตะวัน.....	8
3	รากแก่นตะวัน.....	8
4	ใบแก่นตะวัน.....	8
5	ดอกแก่นตะวัน.....	9
6	แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH radical หลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระโดย วิธี DPPH.....	20
7	โครงสร้างทางเคมีของ ABTS [2,2'–azino–bis (3–ethylbenzthiazoline–6–sulphonic acid)]	21
8	Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	23
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซีกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย.....	44
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซีกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย.....	44
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานบีเอช–เอกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย.....	46
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานบีเอช–เอกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย.....	46
13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย....	49
14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย...	49
15	กราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย.....	53
16	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม.....	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
17	กราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม.....	71
ก1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี DPPH.....	81
ก2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี ABTS.....	83
ก3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมวิธี Folin–Ciocateu.....	85

อักษรย่อ

DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	=	2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sul-phonic acid
BHA	=	Butylated hydroxyanisole
GAE	=	Gallic acid equivalent
TEAC	=	Trolox Equivalent Antioxidant capacity
IC_{50}	=	50% Inhibitory concentration
ppm	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
SD	=	Standard deviation
nm	=	นาโนเมตร
ml	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ ไอออนหรืออะตอมโมเลกุลซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว อนุมูลอิสระอาจมีประจุเป็นบวก ลบหรือเป็นศูนย์ โดยอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหล่านี้ทำให้อนุมูลอิสระว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นพิษต่อร่างกายคล้ายคลึงกับการทำปฏิกิริยาของออกซิเจนกับเหล็ก ส่งผลให้เหล็กขึ้นสนิม รวมถึงการที่น้ำมันถูกเก็บไว้นานๆ แล้วมีกลิ่นเหม็นหืน ซึ่งก็เป็นผลจากการทำปฏิกิริยาของน้ำมันกับออกซิเจนก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเช่นกัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังมีบทบาทสำคัญในเมทาบอลิซึมที่เป็นตัวกลางของสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด [1]

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาภายในร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อมีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิล มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น ได้รับจากอาหารบางชนิด จากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูงๆ กลับมาใช้ หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเลต การแผ่รังสี รังสีเอกซ์ หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์หากได้รับมากเกินไป หรือในภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ลดลงก็จะทำให้อนุมูลอิสระมีมากเกินไป จึงเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ได้ [2]

อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน โปรตีน หน่วยพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ โรคแก่ก่อนวัย เป็นต้น

อนุมูลอิสระมีอยู่หลายชนิด ทุกครั้งที่ร่างกายเผาผลาญสารอาหารให้เป็นพลังงาน ออกซิเจนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นอนุมูลอิสระที่มีชื่อว่า ซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide) ซึ่งเป็นอันตราย ร่างกายจึงต้องมีกลไกในการป้องกัน และกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ เช่น วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอี ที่ร่างกายได้รับจากอาหาร นอกจากนั้น ร่างกายยังมีเอนไซม์ ที่ช่วยเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ที่เป็นอันตรายนี้ ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน การที่เอนไซม์เหล่านี้

จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะต้องมีสารอาหารที่จำเป็น อันได้แก่ กลูต้าไธโอน วิตามินบี 2 สังกะสี และซีลีเนียม

ดังนั้นการทำลายหรือควบคุมปริมาณของอนุมูลอิสระดังกล่าว อาจช่วยในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆได้ สารที่นำมาใช้ในการต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หรืออาจเรียกว่า สารกำจัดอนุมูลอิสระ คือสารที่สามารถยับยั้ง หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) โดยปกติแล้วร่างกายมีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระมาตั้งแต่เกิด สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีบทบาทที่จะช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำราย และป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ดังนั้นจึงควรเลือกรับประทานอาหารจากธรรมชาติ ที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ และอาจรับประทานอาหารเสริมที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอย่างถูกหลักเพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ในอนาคต [3]

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารต้นอนุมูลอิสระอย่างแพร่หลาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมักพบมากในพืชผักและผลไม้บางชนิด จึงได้มีการสนับสนุนให้เป็นทางเลือกหนึ่งในการดูแลสุขภาพ ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาสารที่ส่งเสริมสุขภาพ โดยเฉพาะงานวิจัยที่เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักจึงมีความสำคัญอย่างมากในการช่วยป้องกันปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้เกิดโรคต่างๆ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระเข้ามามีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารโดยการประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลริสระ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของอาหารให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค และผู้ผลิตอาหาร ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อวิจัยหาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดกิ่งปิ้งขาวในตัวทำละลายต่างชนิดกัน เพื่อนำมาใช้เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ ตลอดจนการพัฒนารูปแบบของผลิตภัณฑ์ [4]

แก่นตะวันเป็นพืชวงศ์ทานตะวัน (วงศ์ Asterales) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Helianthus tuberosus L. ซึ่งพืชในวงศ์ทานตะวันนี้ มีลักษณะเป็นพืชล้มลุก มีดอกเป็นสีเหลืองคล้ายดอกบัวตอง ส่วนหัวอยู่ใต้ดิน มีลักษณะคล้ายขิงและข่า การเจริญเติบโตของแก่นตะวันมีสองช่วง ช่วงแรกนับตั้งแต่ปลูกจนถึงออกดอกครั้งแรก แก่นตะวันจะสะสมอาหารในใบและลำต้น ช่วงที่สองหลังจากดอกแรกบานจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ใบจะหลุดร่วง อาหารสะสมที่ใบส่งไปที่หัว ซึ่งแก่นตะวันก็เป็นหนึ่งในตัวช่วยควบคุมน้ำหนักตัวได้เป็นอย่างดี[5] แต่ยังไม่มีการนำแก่นตะวันมาศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงมีการศึกษาพืชชนิดนี้โดยพืชจำพวกนี้เป็นอีกหนึ่ง

แนวทางที่จะนำมาใช้ในการดูแล บำรุงรักษา ป้องกันสุขภาพของร่างกายซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดโดยใช้ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล เพื่อนำมาเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาทางเภสัชวิทยา ยา และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยวิธี DPPH ซึ่งทำการตรวจวัดโดยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยใช้วิธี ABTS ซึ่งทำการตรวจวัดโดยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยวิธี FRAP ซึ่งทำการตรวจวัดโดยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.2.4 เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยใช้วิธี Folin–Ciocalteu ซึ่งทำการตรวจวัตโดยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 ถ้าสารสกัดหัวแก่นตะวันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่จริง เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH จะเกิดการฟอกจางสีจากสีม่วงของสารละลาย DPPH radical เปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส โดยใช้วิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรีได้

1.3.2 ถ้าสารสกัดหัวแก่นตะวันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่จริง เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี ABTS จะเกิดการฟอกจางสีจากสีน้ำเงินของสารละลาย ABTS radical จางลง โดยใช้วิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรีได้

1.3.3 ถ้าสารสกัดหัวแก่นตะวันมีสารฟีนอลิกอยู่จริงเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Folin–cocolteu จะต้องเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินซึ่งสามารถหาปริมาณฟีนอลิกได้ โดยใช้วิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

1.3.4 ถ้าสารสกัดหัวแก่นตะวันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่จริง เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี FRAP จะต้องเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินซึ่งสามารถหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยใช้วิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี–วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

1.4 ขอบเขตการศึกษาของงานวิจัย

1.4.1 ขอบเขตด้านระยะเวลาการศึกษา

1. เริ่มต้นศึกษา เมื่อวันที่ 1 เดือน มกราคม 2562
2. สิ้นสุดการศึกษา เมื่อวันที่ 5 เดือน เมษายน 2562

1.4.2 ขอบเขตด้านเนื้อหา

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยใช้วิธี DPPH
3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยใช้วิธี ABTS
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยใช้วิธี FRAP
5. ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยใช้วิธี Folin–Ciocalteu

1.4.3 ขอบเขตด้านพื้นที่

1. เก็บตัวอย่างหัวแก่นตะวัน ในพื้นที่จังหวัดพะเยา ประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการเคมี SC2315 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
3. ห้องปฏิบัติการเคมี SC2310 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
4. ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทำให้ทราบว่าสารสกัดหัวแก่นตะวัน มีปริมาณฟีนอลิกมากน้อยเพียงใด

1.5.2 สามารถนำงานวิจัยนี้ไปเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ในด้านเคมี ชีวเคมี เภสัชกรรม และทางการแพทย์

1.6 แนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์

1.6.1 เพื่อส่งเสริมให้หัวแก่นตะวัน เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่สามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้

1.6.2 สามารถนำงานวิจัยนี้ไปเป็นแนวทางพัฒนาสารสกัดหัวแก่นตะวัน ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม นำไปเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นประโยชน์ในการเสริมสร้างสุขภาพ และการบำบัดหรือป้องกันโรคเรื้อรังต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หัวแก่นตะวัน[6] [7] [8]

ภาพที่ 1 หัวแก่นตะวัน

ที่มา : https://puechkaset.com/แก่นตะวัน

1. **ชื่อวิทยาศาสตร์**

   Helianthus tuberosus L.

2. **ชื่อวงศ์**

   ASTERACEAE หรือ COMPOSITAE

3. **ชื่อพื้นเมือง**

   แก่นตะวัน แห้วบัวตอง มันทานตะวัน

4. **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์**

   แก่นตะวันจัดอยู่ในกลุ่ม Asteraceae เป็นพืชประเภทล้มลุก มีอายุสั้นประมาณ 120–180 วัน มีลำต้นเหนือดินลักษณะกลม เปลือกลำต้นมีสีม่วงเข้ม มีขนยาวแข็ง ขนาดลำต้นประมาณ 1–3 เซนติเมตร สูงประมาณ 1.5–2 เมตร ส่วนลำต้นใต้ดินเรียกว่าหัว เป็นลำต้นสะสมอาหาร หัวมีลักษณะแบ่งเป็นแง่งยาว และเป็นตะปุ่มตะป่ำเป็นแนวยาวตามความยาวของหัว เปลือกบางสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีขาวกรอบ ขนาดหัวประมาณ 2–6 เซนติเมตร ยาวได้ถึง 6–20 เซนติเมตร ส่วนรากเป็นรากแขนงที่แตกออกบริเวณโคนต้น ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามสลับฉากกัน แต่ละใบจะมีก้านใบยาว

2–4 เซนติเมตร กว้างประมาณ 6–8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10–15 เซนติเมตร ฐานใบรูปสอบแคบ ปลายใบเรียวแหลม แผ่นใบเรียบ เนื้อใบบาง ขอบใบเป็นฟันเลื่อย แผ่นใบทั้งด้านบนและด้านล่างมีขนสั้นแข็งปกคลุม แผ่นใบมีเส้นแขนงใบ 6–9 เส้น ดอกเป็นช่อ มีก้านช่อดอกหลักยาวประมาณ 30–50 เซนติเมตร จากนั้นแตกก้านดอกย่อยออก แต่ละดอกมีขนาด 6–8 เซนติเมตร ลักษณะเป็นทรงกลมแบน ออกดอกเป็นช่อ ดอกมีสีเหลืองคล้ายกับดอกทานตะวันหรือบัวตองแต่เล็กกว่า ส่วนผลแก่นตะวันมักเรียกเป็นเมล็ด มีลักษณะมีรูปลิ่มคล้ายเมล็ดดาวเรือง ปลายเรียวยาว เปลือกผลมีสัน 4 สัน สีน้ำตาลอ่อน มีลายสีน้ำตาล และมีขนสั้นแน่นปกคลุม ขนาดผลกว้างประมาณ 2–3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 5–8 มิลลิเมตร ด้านในเป็นเนื้อเมล็ด 1 เมล็ด

5. การกระจายพันธุ์

แก่นตะวัน เป็นพืชตระกูลเดียวกันกับทานตะวัน มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ และเป็นพืชท้องถิ่นของแคนาดา ปัจจุบันพบปลูกทั่วไปในสหรัฐอเมริกา แคนาดา ฝรั่งเศส รัสเซีย จีน แอฟริกากลาง และออสเตรเลีย รวมถึงประเทศไทย

6. การใช้ประโยชน์

- หัวแก่นตะวันจัดเป็นอาหารที่ดีและมีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากในหัวของแก่นตะวันนั้นอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ มากมาย ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น มีวิตามินบีรวม แคลเซียม ธาตุเหล็กที่สูง เป็นต้น
- หัวใช้รับประทานสดๆ เป็นผัก ซึ่งหัวสดจะมีรสชาติคล้ายๆ กับแห้ว หรือนำมาประกอบอาหารทั้งคาวและหวาน ทำเป็นขนม ใช้ต้มรับประทาน หรือนำไปผัดหรือใช้ยำก็ได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้แทนมันฝรั่งได้ เพราะมีเนื้อสัมผัสเช่นเดียวกัน เพียงแต่ว่ามีรสหวานกว่า จึงเหมาะสำหรับใส่ในสลัดผักต่างๆ
- หัวแก่นตะวันสามารถนำมาทำเป็นผง คือเอาหัวมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาตากแดดให้แห้งแล้วอบ เมื่ออบเสร็จก็นำมาป่นเป็นผงเล็กๆ ซึ่งผงดังกล่าวสามารถนำไปผสมกับแป้งต่างๆ เป็นผลิตภัณฑ์ได้ เช่น ขนมปัง ขาไก่ คุกกี้ เป็นต้น จะช่วยทำให้มีรสชาติที่ดีและมีกลิ่นหอม และคงปริมาณของอินนูลินไว้
- มีการนำหัวแก่นตะวันมาสกัดเอาสารอินนูลิน ใช้ผสมในผลิตภัณฑ์นมผงเด็ก โดยจะมีสารอินนูลินผสมอยู่ด้วยราว 1–2 เปอร์เซ็นต์

- หัวแก่นตะวันใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นสุราและเอทานอลได้ ซึ่งในประเทศเยอรมัน รัฐบาเดิน–เวอร์ทเทมแบร์ก จะมีการใช้หัวแก่นตะวันในการผลิตสุรามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสุราชนิดนี้ก็คือ Topi หรือ Rossler
- ลำต้นแก่นตะวันสามารถนำไปหมักทำเป็นเอทานอลได้
- หัวใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์เลี้ยง เพราะมีผลต่อการเจริญเติบโต ทำให้สัตว์เลี้ยงมีสุขภาพแข็งแรง ช่วยลดจุลินทรีย์ที่เป็นโทษในระบบทางเดินอาหาร ช่วยลดกลิ่นเหม็นของมูลสัตว์ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้สัตว์เลี้ยง ช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ จึงมีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรของสัตว์เลี้ยง
- ในเชิงอุตสาหกรรม มีการใช้หัวแก่นตะวันมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดเป็นน้ำตาลอินนูลิน (Inulin) เพราะสามารถพบได้ในพืชชนิดนี้มากถึง 16–39 เปอร์เซ็นต์ และยังมีการใช้ อินนูลินเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลเชื่อมรุกโตสเข้มข้น หรือสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมอาหาร
- แก่นตะวันเป็นพืชที่ให้พลังงานสูง หัวสด 1 ตัน สามารถใช้ผลิตเป็นเอทานอลบริสุทธ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ได้มากถึง 100 ลิตร สามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนด้วยการนำไปใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน ใช้ผลิตแก๊สโซฮอล์ได้
- แก่นตะวันเป็นพืชเศรษฐกิจที่กำลังได้รับความนิยม เพราะสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย ผลิตภัณฑ์แก่นตะวัน เช่น แก่นตะวันแบบบรรจุถุง แก่นตะวันบดผง แก่นตะวันอบแห้ง ชาแก่นตะวัน ว่านแก่นตะวันแคปซูล สบู่แก่นตะวัน เป็นต้น
- แก่นตะวันมีดอกที่สวยงาม จึงมีการเพาะปลูกไว้เป็นไม้ประดับ ปลูกเป็นพืชเพื่อการท่องเที่ยว เพื่อเป็นที่พักผ่อนหย่อนใจได้

7. ส่วนต่างๆของแก่นตะวัน

ภาพที่ 2 ต้นแก่นตะวัน

ที่มา : https://medthai.com/แก่นตะวัน

ภาพที่ 3 รากแก่นตะวัน

ที่มา : https://medthai.com/แก่นตะวัน

ภาพที่ 4 ใบแก่นตะวัน

ที่มา : https://medthai.com/แก่นตะวัน

ภาพที่ 5 ดอกแก่นตะวัน

ที่มา : https://medthai.com/แก่นตะวัน

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร[9]

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

1) คุณสมบัติเบื้องต้น

คัดเลือกสมุนไพรที่สามารถกินเป็นอาหาร หรือมีสรรพคุณเป็นยากินพื้นบ้าน หรือยาแผนโบราณ (Folk medicine, herbal remedies) ซึ่งถือว่าเป็นกลุ่มพืชสมุนไพรที่ค่อนข้างมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง

2) คุณสมบัติเฉพาะ

คัดเลือกพืชในวงศ์ (Family) เดียวกันหรือวงศ์ที่ใกล้เคียงกันกับพืชที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.2.2 ประเภทพืช

1) พืชสด (Fresh plant material)

โดยมากใช้ในยาแผนโบราณ แต่งกลิ่นอาหาร และผลิตภัณฑ์น้ำหอม ใช้ตัวอย่างพืชสดเพื่อรักษาคุณสมบัติที่สำคัญ เช่น ไทม์สด (Thyme) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ แต่หากตัวอย่างของพืชแห้งจะมีผลทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานี้หมดไป โดยทั่วไปการสกัดจะได้ผลดีเมื่อสามารถสกัดสารจากพืชสด โดยการนำพืชสดที่เก็บมาต้มกับแอลกอฮอล์ เพื่อฆ่าเอมไซม์ก่อนการสกัด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีต่างๆ ภายในพืช

2) พืชแห้ง (Dried plant material)

ส่วนใหญ่พืชประเภทนี้จะได้มาจากร้านสมุนไพร แต่หากต้องเก็บพืชสดมาทำให้แห้งเอง จำเป็นต้องใช้วิธีที่เหมาะสม วิธีการทำตัวอย่างพืชให้แห้งมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและสารสำคัญในพืช โดยเฉพาะพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย (Volatile oil,

Essential oil) จะต้องระวังมาก เพราะที่อุณหภูมิสูงปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะลดลง

2.2.3 การทำสมุนไพรให้แห้ง

วิธีการทำให้แห้งสามารถคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงอาจทำให้สาระสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไป การทำสมุนไพรให้แห้งอาจทำได้โดย

1) การทำให้แห้งในอากาศ (Air drying)

เช่น ทำให้แห้งในที่ร่ม (Shade drying) หรือตากแห้ง (Sun drying)

2) การทำให้แห้งโดยความร้อนจากแหล่งพลังงานอื่น (Artificial heat)

เช่น พลังงานไฟฟ้า โดยการเข้าตู้อบที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและอากาศที่ผ่านเข้าออกได้ดีกว่า เนื่องจากที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอน แต่ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้เสียฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.4 การแตกย่อยเนื้อเยื่อ

เป็นการทำให้ตัวอย่างพืชมีขนาดเล็กลง เพื่อให้ตัวสกัด เช่น ตัวทำละลาย หรือไอน้ำแทรกซึมผ่านเซลล์พืชได้ทั่วถึง สามารถสกัดสาระสำคัญจากพืชได้ผลดี วิธีการแตกย่อยเนื้อเยื่อ 3 วิธี ได้แก่

1) การย่อยด้วยเครื่องมือ (Mechanical disintegration)

เป็นวิธีการทำให้ตัวอย่างพืชมีขนาดเล็กลงโดยอาศัยเครื่องมือที่เหมาะสม เช่น การบดด้วยครก การหั่นด้วยมีด การปั่นด้วยเครื่องปั่น ฯลฯ

2) การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic disintegration)

เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ สำหรับย่อย Pectin และ Ellulose เป็นต้น

3) การย่อยด้วยการเคมี (Chemical disintegration)

เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้สารเคมี เช่น Dimethyl formide, Cholic, Deoxycholic acid, Sodium dodecyl sulfate และ Phenol ฯลฯ เพื่อให้เซลล์แตก

2.3 การสกัดสาระสำคัญจากพืช

การสกัดสาระสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ฯลฯ แต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันไป วิธีการสกัดสาระสำคัญจากพืชแบ่งออกเป็น 5 วิธี ได้แก่

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

2.3.2 การสกัดด้วยเครื่องมือ (Mechanical extraction)

2.3.3 การสกัดด้วยการกลั่น (Distillation)

2.3.4 การสกัดด้วยการดูดซับ (Resorption)

2.3.5 การสกัดด้วยการบีบ (Expression)

ในที่นี้จะอธิบายเพียง 1 วิธีการ ที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดเพื่อการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพร คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

เป็นการสกัดสาระสำคัญจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ความสามารถของสารสกัดกับอัตราการซึมผ่าน (Rate of diffusion) ของส่วนที่ละลายได้ผ่านชั้นสัมผัสของของเหลว ที่ทำหน้าที่เป็นตัวสกัด (Solvent) กับสารตั้งต้นที่นำมาสกัด โดยขั้นตอนในการสกัดอาจผ่านกระบวนการต่างๆ ดังนี้

1) การหมัก (Maceration)

เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ โถแก้ว และถังพลาสติก ฯลฯ ภายในระยะเวลาที่กำหนด (ประมาณ 2–7 วัน) โดยในระหว่างการหมักต้องหมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เพื่อให้ตัวอย่างพืชสัมผัสกับตัวทำละลายมากที่สุด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินสารสกัดออกและพยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด ทำซ้ำหลายๆครั้ง จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ จากนั้นรวมสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดนำไปกรอง (Filtration) เพื่อแยกเอากากสมุนไพรออกไป การสกัดด้วยวิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2) การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentrated extraction)

หลังจากสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักเจือจางและมีปริมาตรมาก การแยกส่วนหรือการศึกษาต่อไปทำได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องแยกตัวทำละลายออกไปเพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้น (Concentrated

extraction) และปราศจากตัวทำละลาย โดยการระเหยด้วยการกลั่นในสุญญากาศ (Distillation in vacuum) เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงจนเกือบเป็นสุญญากาศ การกลั่นโดยวิธีนี้ต้องอาศัยการทำงานของเครื่องมือหลัก 3 ชนิด ประกอบกัน ได้แก่

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporation)
2. เครื่องทำน้ำหล่อเย็น (Cool ace)
3. เครื่องดูดอากาศเพื่อทำสุญญากาศ (Vacuum pump, aspirator)

ในส่วนของเครื่อง Rotary evaporation ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ ขวดกลั่น (Distillation flask) เป็นภาชนะที่บรรจุสารสกัดที่ต้องการทำให้เข้มข้น หลอดควบแน่น (Condenser) เป็นแหล่งทำความเย็นเพื่อให้ไอระเหยของตัวทำละลายกลั่นตัวเป็นของเหลวและขวดรับตัวทำละลาย (Receiving flask) ในการทำงานขวดกลั่นที่บรรจุสารสกัดจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำและหมุนอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ความร้อนกระจายได้อย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ เมื่อสารละลายในขวดกลั่นเดือด (อุณหภูมิประมาณ 100–120 °C) จะระเหยเป็นไอผ่านไปยังหลอดควบแน่นแล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวลงสู่ขวดรับตัวทำละลาย ทำการกลั่นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งสารสกัดเกือบแห้ง เทใส่ขวดสีชานำไประเหยตัวทำละลายที่อาจตกค้างออกให้หมดบนเครื่องทำความร้อน (Hot plate) โดยใช้ระดับความร้อนต่ำ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เครื่องมือที่ใช้ในการทำสารสกัดให้เข้มข้นที่ดีต้องมีระบบการทำสุญญากาศที่ดี ระหว่างขวดกลั่น และหลอดควบแน่นสั้น และมีระบบทำความเย็นของหลอดควบแน่นที่ดี

3) การแช่แข็ง (Freezing)

การแช่แข็งทำให้สารสกัดกลายเป็นของแข็ง หากเป็นสารที่สกัดด้วยน้ำหรือมีน้ำปนมาด้วยหลังจากแช่แข็งแล้วจะนำไปกำจัดน้ำออกด้วยเครื่อง Lyophilized แต่หากเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่เป็นของแข็งที่สามารถแยกออกจากการสกัดโดยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugation)

2.4 อนุมูลอิสระ [9]

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออบิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง คำจำกัดความนี้รวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชัน นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกสิเจนซึ่งรับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอน แต่ละอิเล็กตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ลออบิทัล อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูล หรืออนุมูลอิสระคืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\bullet}$ อนุมูล $A^{\bullet-}$ และอนุมูล $A^{\bullet+}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีมวลโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น

ดังนั้น อนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา สามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีจำนวนน้อยชนิดมาก ตัวอย่าง อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($OH^{\bullet}$) อนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี่($H_2O^{\bullet}$) อนุมูลอิระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก

2.4.1 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ [10]

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้มีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกร่างกายดังนี้

1) ปัจจัยภายในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมาย ที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่ากระบวนการเมทาบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Auto oxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (Initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสง หรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2. ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (Peroxy radical) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydro peroxide) และอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ

3. ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งการทำงานของเอ็นไซม์สำคัญ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้แก่

1. เอ็นไซม์แซนธีนออกซิเดส (Xanthine oxidase : XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (Purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโพแซนธีน (Hypoxanthine) เป็นแซนธีน (Xanthine) และแซนธีน เป็นกรดยูริก (Uric acid) พร้อมๆ กับเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$)

2. เอ็นไซม์ไลโพออกซีจีเนส (Lipoxygenase: LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมัน เกิดเป็นไฮโดรเพอรอกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมัน

กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) โดยการทำงานของเอ็นไซม์ NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อบุชั้นนอก (Outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว

โลหะทรานสิชัน (Transition metal) โลหะทรานสิชัน 2 ชนิดคือ เหล็ก (Fe^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกาย สามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลจากซูปเปอร์–ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction)

2) ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (Bleomycin) แอนทราไซคลินส์ (Antracyclines) และเมโธทรีเสต (Methotrexate) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยา ออกซิเดชัน (Prooxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (Xray), รังสีแกมมา (γ–ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกาย จากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้น ได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น

ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจน–ออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตรตะคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอ็นไซม์ ไซโทโครม P–450 ไฮดรอกซีเจส (Cytochrome P–450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอด และลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว

2.4.2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

ตาราง 1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

Reactive oxygen species			
Free radicals	**Formula**	**Non–radicals**	**Formula**
Oxygen radical	$O_2^{\bullet}$	Singlet oxygen	$^1O_2$*
Superoxide radical	$O_2^{\bullet-}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hydroxyl radical	$OH^{\bullet}$	Ozone	O_3
Hydroperoxyl radical	$HO_2^{\bullet}$	Organic peroxide	ROOH
Peroxyl radica	$RO_2^{\bullet}$		
Alkoxyl radical	$RO^{\bullet}$		
Carbonate radical	$CO_3^{\bullet-}$		
Reactive chlorine species			
Chlorine radical	$Cl^{\bullet}$	Hypochloric acid	HOCl
		Nitryl chloride	NO2Cl
		Chlorine gas	Cl2
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 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

การสร้างอนุมูลอิสระหรือการกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระทั้งจากอนุมูลอิสระและสารที่ไมใช่อนุมูลอิสระ (Non–radicals) ของ ROS และ RS ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวน มากซึ่งไมสมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ที่ถูกสร้างขึ้นในการกำจัดทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ไดแก โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาท โรคภูมิแพ โรคความ ผิดปกติเกี่ยวกับสายตา รวมถึงการแกชรา เป็นต้น

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ [11]

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลลิค (Phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (Catotinoid) บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้อง ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้พยายามพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง

อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระ อยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน (β–carotenoid) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่าง สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

(Superoxide dismutase) สารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (Albumin) บิลิรูบิน (Bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (Ceruloplasmin) กลูตาไธโอน (Glutathione) ทรานสเฟอริน (Transferrin) ยูบิควินอล (Ubiquinol) และยูเรต (Urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่างๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของรางก่าย ซึ่งถ้าสะสมมากๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหลายอย่าง

2.5.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผัก เครื่องเทศ องุ่น และสมุนไพร ได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) สารประกอบฟีนอลิก สังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่

1. Propyl gallate
2. 2–butylated hydroxyanisole
3. 3–butylate hydroxyanisole
4. BHT (butylated hydroxytoluene)
5. Tertiary butylhydroquinone

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค

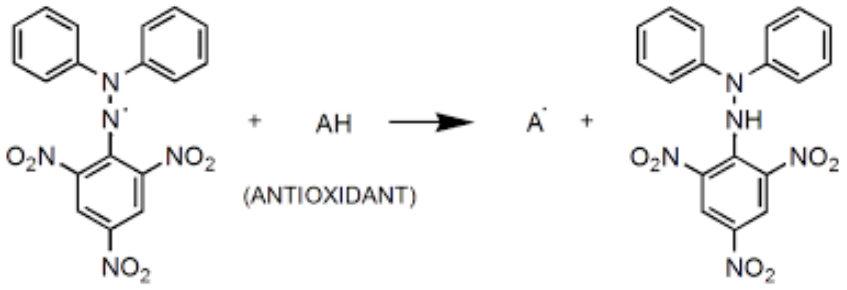
2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (Nonnutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) เช่น แซนโธน (Xanthone) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งประกอบด้วย

หมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (Aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (Functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอล ที่มีโครงสร้างของ Ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับ กับโลหะดังกล่าว เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (In vitro) และในสิ่งมีชีวิต

2.6 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม [12]

2.6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$, 2,2-diphynyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงจะต้องทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH



ภาพที่ 6 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ DPPH radical หลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

1) สูตรคำนวณของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในสารต้านอนุมูลอิสระออกมาในค่า %inhibition ตามสมการ ดังนี้

โดย $A^{Control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A^{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

%inhibition = $[(A^{Control} - A^{Sample}) / A^{Control}] \times 100$

2) ข้อดีและข้อด้อยของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสะโดยวิธี DPPH

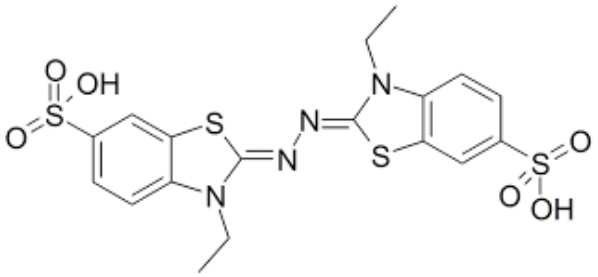
1. ข้อดีของวิธี DPPH คือ ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นกลุ่มแคโรตินอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

2. ข้อด้อยของวิธี DPPH คือ อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์ร่างกาย จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะ จะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

2.6.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

การทดสอบวัดความสามารถในการฟอกจางสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$, 2,2'–azino–bis (3–ethylbenzothiazoline–6–sulfonic acid) radicals) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียว ปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{\bullet+}$ ให้เป็น 0.7±0.2 เนื่องจาก $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสง

สูง จึงต้องทำการเจืองจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ นั่นคือ %inhibition ตามสมการ ผลการวิเคราะห์จะคำนวนเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS

[2,2'–azino–bis (3–ethylbenzthiazoline–6–sulphonic acid)]

1) สูตรคำนวณของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

สูตรคำนวนได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่สารตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังนี้

โดย $A^{Control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A^{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

%inhibition = $[(A^{Control} - A^{Sample}) / A^{Control}] \times 100$

2) ข้อดีและข้อด้อยของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสะโดยวิธี ABTS

1. ข้อดี ของวิธี ABTS คือ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยารวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายน้ำและไขมัน สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่กว้าง

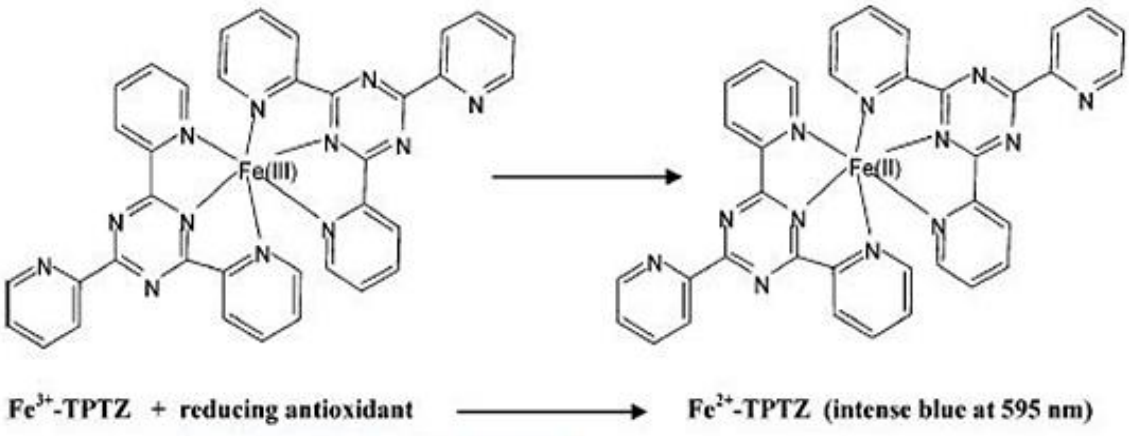
2. ข้อด้อย ของวิธี ABTS คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างการหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocaltaeu

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนลิกรวมทั้งหมดโดยวิธี Folin–Ciocaltaeu method อาศัยหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกรวมทำปฏิกิริยากับรีเอเจนของ Folin–Ciocaltaeu ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวมเกิดเป็น Tungsten และ Molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน

2.6.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

วิธีการทดสอบนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสะได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ประกอบด้วย นำสารละลาย TPTZ (2,4,6–tri (2–pyridyl)–s–triazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเทตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ใน ที่มืด 30 นาทีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง



ภาพที่ 8 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ที่มา : https://www.emaze.com/@AWZFOZC

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง [13] [14]

ปี 2559 สุรพงศ์ รัตนะ และบันลือ สังข์ทอง ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้หอมห้าชนิด มีวัตถุประสงค์เพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟีนอลิกของสารสกัดเมทานอลของกลีบดอกของดอกไม้หอมห้าชนิดคือ ดาหลา (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith) พิกุล (*Mimusops elengi* L.) แก้ว (*Murraya paniculate* (L.) Jack) บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth) และกุหลาบ (*Rosa* sp.) หาปริมาณ ฟีนอลิกด้วย Folin–Ciocalteau method และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH และ ABTS method จากผลการวิจัยพบว่า สารสกัดที่ให้ปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดได้แก่ กุหลาบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น (p<0.05) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า EC_{50} ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 12.26 ± 0.80 และ 8.93 ± 1.10 µg/mL ตามลำดับ แตกต่างกับพืชอื่น (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างกับ Ascorbic acid (p>0.05) และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ด้วย Pearson Correlation พบว่าปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r = 0.899 และ 0.943) ตามลำดับ

ปี 2558 ปิยนุช เจริญผล และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง ได้ศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัด เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบดาวเรืองสดซึ่งยังไม่เคยมีรายงาน โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 ระบบ พบว่าตัวทำละลายด้วยระบบ 10% EtOH/EtOAc ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดคือ ร้อย

ละ 54 ซึ่งสูงกว่าระบบอื่นเป็น 13 เท่า และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้วิธี Folin–Ciocalteau Colorimatric assay, วิธี Aluminium chloride colorimetric assay และวิธี DPPH assay ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าระบบ 60% H_2O/EtOH มีปริมาณฟีนอลิก (56.1 mg GAE/g crude extract, 10%) ระบบ 50% H_2O/EtOH มีฟลาโวนอยด์ (8.52 mg QGE /g crude extract, 17%) มากที่สุด และ 40% H_2O/EtOH แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด (IC_{50} = 12.44±0.01 ppm) ดังนั้นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด มี 2 ระบบ คือ 10% EtOH:EtOAc (ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด) และระบบ 40–60% H_2O/EtOH (แสดงค่าปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด) (Gallic acid คือ 5.80 ppm)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เมทานอล (Methanol, CH_3OH) (AR grade. Merck KGaA, Germany)

3.1.2 เอทานอล (Ethanal, CH_3CH_2OH) (AR grade. Merck KGaA, Germany)

3.1.3 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.4 วิตามินซี (L-Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$, ASSAY 99.0-100.5%) (AR grade, Chem-supply Pty Ltd, Australia)

3.1.5 บิวทิลเลต ไฮดรอกซีแอนิโซล (BHA, 2-tert-butyl-4-methoxyphenol, $C_{11}H_{16}O_2$, ASSAY≥98.5%) (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.6 2,2-อะซิโน-บิส (3-เอททิลเบนโซโทโซลีน-6-ซัลโฟนิค แอสิค) (ABTS, $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$, Mw = 548.68, ASSAY>98.0%) (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.7 โฟลิน-เซียคัลธู (Folin-Ciocalteu) (AR grade, Merck KGaA, Germany)

3.1.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate, Na2CO3, ASSAY 99.8%) (AR grade, Ajax Finechem, Australia)

3.1.9 กรดแกลลิก (Gallic acid, $C_7H_6O_5$, ASSAY>98.0%) (Sigma-Aldrich, Fluka, Spain)

3.1.10 เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}) (Commercial grade)

3.1.11 เอทิลอะซีเตท (Ethy Acetate, $C_4H_8O_2$) (Commercial grade)

3.1.12 เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH) (Commercial grade)

3.1.13 น้ำกลั่น

3.1.14 โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa)

3.1.15 ไฮโดรคลอริก (HCl)

3.1.16 ทีพีทีแซด 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine , TPTZ

3.1.17 เฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$)

3.1.18 ไดคลอโรมีเทน (Dichorometane, CH_2Cl_2) (Commercial grade)

3.2 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1	บีกเกอร์	ขนาด 25 50 100 และ 500 มิลลิลิตร
3.1.2	หลอดทดลอง	ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
3.1.3	กระบอกตวง	ขนาด 100 มิลลิลิตร
3.1.4	ขวดรูปชมพู่	ขนาด 2,000 มิลลิลิตร
3.1.5	ขวดก้นกลม	ขนาด 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
3.1.6	ไมโครปิเปต	ขนาด 10–100 100–1.000 และ 1,000–10,000 ไมโครลิตร
3.1.7	ขวดปรับปริมาตร	ขนาด 5 10 25 50 และ 100 มิลลิลิตร
3.1.8	ไมโครปิเปตทิป	ขนาด 100 1,000 และ 10,000 ไมโครลิตร
3.1.9	เซลล์บรรจุสารตัวอย่าง	ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3.1.10	กรวยกรอง	
3.1.11	แท่งแก้วคนสาร	
3.1.12	อะลูมิเนียมฟอยล์	
3.1.13	พาราฟิล์ม	
3.1.14	ขวดสีชาเก็บสาร	
3.1.15	ผ้าขาวบาง	
3.1.16	โหลแก้วแช่สาร	
3.1.17	ตะแกรงวางหลอดทดลอง	
3.1.18	ช้อนตักสาร	
3.2.19	ถุงมือยาง	
3.2.20	ซิลิก้าเจล หรือสารดูดความชื้น	
3.2.21	โถแก้วดูดความชื้น	
3.2.22	หลอดหยอด	

3.3 เครื่องมือ

3.3.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)

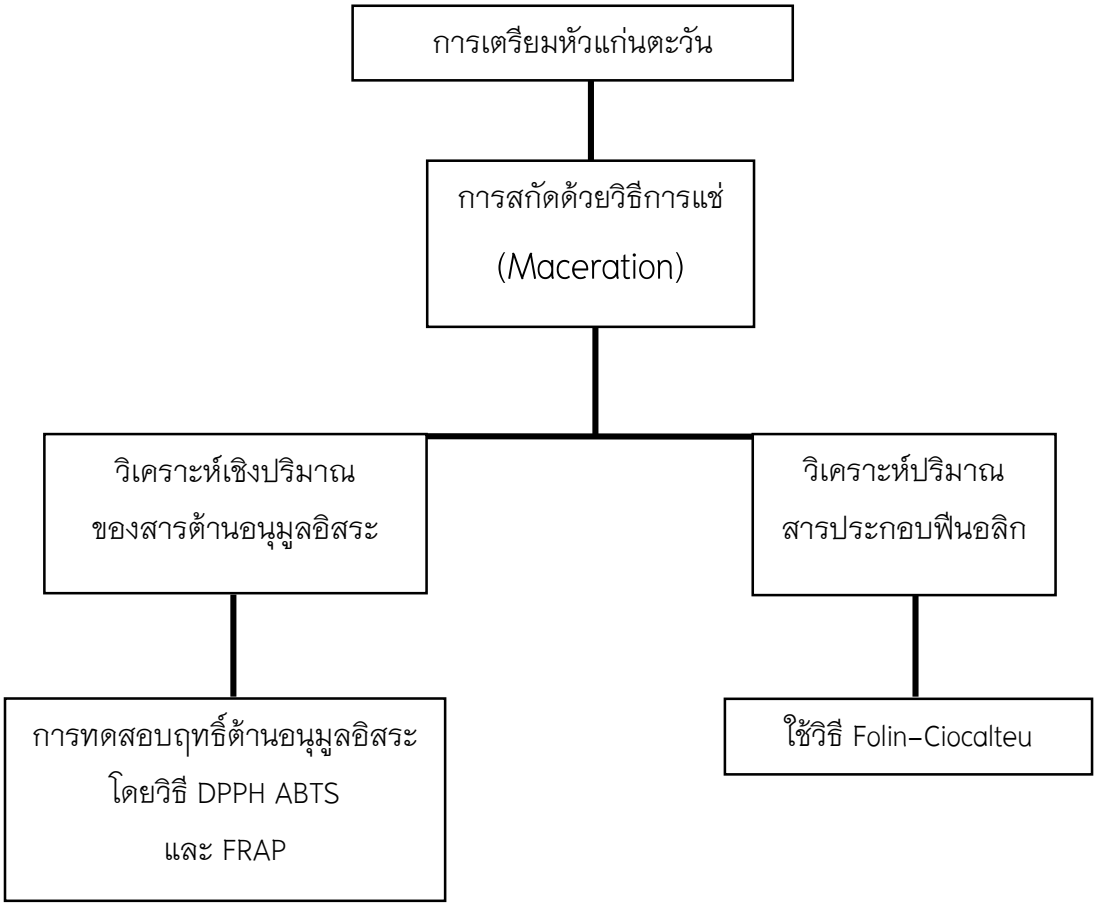
3.3.2 เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3.3 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dryer)

3.3.4 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator)

3.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Over)

3.4 แผนการดำเนินการวิจัย



3.5 วัตถุดิบ

3.5.1 หัวแก่นตะวัน

3.6 การเตรียมตัวอย่างหัวแก่นตะวัน

3.6.1 นำหัวแก่นตะวัน มาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ และสับให้บางเล็กน้อย จากนั้นจึงนำไปผึ่งลมจนแห้ง และเก็บใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงปิดให้สนิท

3.7 การสกัดสารสกัดหัวแก่นตะวันด้วยตัวทำละลาย

3.7.1 การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70%

นำหัวแก่นตะวันที่ผึ่งลมจนแห้งมาชั่งน้ำหนัก 2 กิโลกรัมบรรจุลงในห่อผ้าขาวบางและนำมาทำการสกัดเย็นโดยตัวทำละลายเอทานอล 70% ในโหลแก้วที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มากรองผ่านสำลี แล้วนำสารละลายมาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน เพื่อให้ได้สารสกัดเอทานอล 70% จากหัวแก่นตะวัน จากนั้นนำชั้นสารสกัดเอทานอล 70% มาทำการแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทในกรวยแยกสารจนได้ชั้นสกัดเอทิลอะซิเตท แล้วนำสารละลายมาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน เพื่อให้ได้ชั้นสารสกัดหยาบหัวแก่นตะวัน

3.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

3.8.1 เตรียมสารละลาย DPPH radical

เตรียมสารละลาย DPPH radical ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร DPPH radical มา 0.0039 กรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.8.2 การวิเคราะห์หาความยาวคลื่นของการทดสอบปฏิกิริยา

1) ปิเปตสารละลาย DPPH radical (ข้อ 3.8.1) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์บรรจุตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 400 – 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็นเบสไลน์

2) ให้ทำการทดลองตาม ข้อ 1 ซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลค่าความยาวคลื่นที่ได้จากการทดลอง เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

3.8.3 การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

1) เตรียมสารละลายวิตามินซีให้มีความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม โดยชั่งวิตามินซีมา 0.0001 กรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาณ 10 มิลลิลิตร

2) ปิเปตสารละลาย DPPH radical (ข้อ 3.8.1) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายวิตามินซี (ข้อ 1) 0.5000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 10 20 30 40 50 และ 60 นาที

3) นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของแต่ละช่วงเวลา ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้เมทา–นอลเป็น blank บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง ได้กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยกับเวลา

3.8.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (Stock solution) โดยชั่งวิตามินซี 0.0100 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock solution) ให้มีความเข้มข้น 2.5 5 10 20 40 80 160 320 และ 640 พีพีเอ็ม โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินซี 1000 พีพีเอ็ม (Stock solution) มา 0.0125 0.0250 0.0500 0.1000 0.2000 0.4000 0.8000 1.6000 และ 3.2000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เป็น 5 มิลิลิตร

3.8.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานบิวทิลเลต ไฮดรอกซีแอนิโซล (BHA)

เตรียมสารละลายมาตรฐานบีเอชเอให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (Stock solution) โดยชั่งบีเอชเอมา 0.0102 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock solution) ให้มีความเข้มข้น 2.5 5 10 20 40 80 160 320 และ 640 พีพีเอ็ม โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานบีเอชเอ 1000 พีพีเอ็ม (Stock solution) มา 0.0125 0.0250 0.0500 0.1000 0.2000 0.4000 0.8000 1.6000 และ 3.2000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เป็น 5 มิลิลิตร

3.8.6 เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวัน ให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (Stock solution) โดยชั่งสารสกัดหัวแก่นตะวัน 0.0250 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้

มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock solution) ให้มีความเข้มข้น 5 10 20 40 80 160 320 640 และ 1,000 พีพีเอ็ม โดยปิเปตสารละลายจาก (Stock solution) มา 0.0250 0.0500 0.1000 0.2000 0.4000 0.8000 1.6000 3.2000 5.0000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล

3.8.7 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1) ปิเปตสารละลาย DPPH radical (ข้อ 3.8.1) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์บรรจุตัวอย่าง 1 เซลล์ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโตโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็น blank ทำซ้ำ 3 ครั้ง (Control)

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม (ข้อ 3.8.4) 0.5000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอกทดลองจากนั้นเติม DPPH radical (ข้อ 3.8.1) 1.0000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

3) นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเมอร์ โดยใช้เมทานอลเป็น blank

4) สำหรับสารละลายแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ และสารสกัดแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ให้ทำการทดลองตามข้อ 2 – 3 ซ้ำ 3 ครั้ง/ 1 ชุด (สารมาตรฐานให้วิเคราะห์ในวันเดียวกัน) บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) เพื่อนำไปพล๊อตกราฟหาค่า IC_{50} ต่อไป (ให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด)

3.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

3.9.1 เตรียมสารละลาย ABTS solution

เตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร ABTS มา 0.0392 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3.9.2 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulphate)

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้มีความเข้มขัน 2.45 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต มา 0.0170 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

3.9.3 การเตรียม $ABTS^{\cdot+}$ stock solution

ปิเปตสารละลาย ABTS solution ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (ข้อ 3.9.1) 8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ 12 มิลลิลิตร (ข้อ 3.9.2) ใส่ในขวดสีชา เขย่าให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ($ABTS^{\cdot+}$ Stock solution 1) และสารอนุมูลอิสระนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน ประมาณ 2–3 วัน ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C โดยก่อนนำมาทดสอบเจือจางสารจาก ($ABTS^{\cdot+}$ stock solution 1) โดยงานวิจัยนี้ใช้สารละลายผสม 2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ($ABTS^{\cdot+}$ Stock solution 2) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.7±0.2

3.9.4 การวิเคราะห์หาความยาวคลื่นของการทดสอบปฏิกิริยา

1) ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ stock solution 2 (ข้อ 3.9.3) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์บรรจุสารตัวอย่าง 1 เซลล์ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 500 –800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นเบสไลน์

2) ให้ทำการทดลองตาม ข้อ 1 ซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลค่าความยาวคลื่นที่ได้จากการทดลอง เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

3.9.5 การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

1) เตรียมสารละลายโทลอกซ์ ให้มีความเข้มข้น 20 พีพีเอ็ม โดยชั่งโทลอกซ์มา 0.0002 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ stock solution 2 (ข้อ 3.9.3) 2.7000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายโทลอกซ์ (ข้อ 1) 0.3000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้ว

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดที่เวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที

3) นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของแต่ละช่วงเวลา ที่ความยาวคลื่น 752 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้เอทา–นอลเป็น Blank บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง พล๊อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยกับเวลา

3.9.6 เตรียมสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ (Trolox)

เตรียมสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ ให้มีความเข้มข้น 60 พีพีเอ็ม (Stock solution) โดยชั่งโทลอกซ์มา 0.0015 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock solution) ให้มีความ 0 10 20 30 40 50 และ 60 พีพีเอ็ม โดยปิเปตสารละลายจาก (Stock solution) มา 0.0000 0.8333 1.6667 2.5000 3.3333 4.1667 และ 5.0000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยเอทานอล

3.9.7 เตรียมสารละลายวิตามินซี (Ascorbic acid)

เตรียมสารละลายวิตามินซี ให้มีความเข้มขัน 100 พีพีเอ็ม โดยชั่งวิตามินซีมา 0.0010 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.9.8 เตรียมสารละลายบิวทิลเลต ไฮดรอกซีแอนิโซล (BHA)

เตรียมสารละลายบีเอชเอ ให้มีความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม โดยชั่งบีเอชเอมา 0.0010 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.9.9 เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวัน ให้มีความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม โดยชั่งสารสกัดหัวแก่นตะวัน 0.0008 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.9.10 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

1) ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ stock solution 2 (ข้อ 3.9.3) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์บรรจุสารตัวอย่าง 1 เซลล์ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 752 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เอทานอลเป็น Blank ทำซ้ำ 3 ครั้ง (Control) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.7±0.2

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ความเข้มข้น 0 พีพีเอ็ม (ข้อ 3.9.6) 0.3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติม $ABTS^{\cdot+}$ stock solution 2 (ข้อ 3.9.3) 2.7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที

3) นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 752 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เอทานอลเป็น Blank

4) สำหรับสารละลายแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มขัน 100 พีพีเอ็ม ให้ทำการทดลองตามข้อ 2–3 ซ้ำ 3 ครั้ง/ 1 ชุด (สารมาตรฐานและสารตัวอย่างให้ทดสอบในวันเดียวกัน) บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) นำไปพล๊อตกราฟเพื่อคำนวณหาค่า TEAC ต่อไป (ให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด)

3.10 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

3.10.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์

ชั่งโซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa.3H_2O$) 2.3 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.10.2 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12 โมลาร์ ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.10.3 การเตรียมสารละลายทีพีทีแซด (2,4,6-tri(2-pyridyi)-s-triazine; TPTZ)

ชั่งสารทีพีทีแซตจำนวน 0.0310 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดไฮรโดรคลอริก (HCl) เจือจาง ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นนำไปละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.10.4 การเตรียมสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (Ferric chloride)

ชั่งเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$) จำนวน 0.054 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.10.5 การเตรียมสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP)

ปิเปตสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายทีพีทีแซดปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรตปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.10.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulfate)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ทำได้โดยชั่งเฟอร์รัสซัลเฟตมา 0.0300 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร คิดเป็นความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเจือจางสารละลายที่เตรียมไว้เฟอร์รัสซัลเฟต ให้มีความเข้มข้น 0 25 50 100 200 และ 400 โดยปิเปตสารละลายมา 0.0000 0. 0042 0.0083 0.0167 0.0333 และ 0.0667 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.10.7 เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวันให้มีความเข้มข้น 80 ppm โดยชั่งสารสกัดหัวแก่นตะวัน 0.0008 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.10.8 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

1. ปิเปตสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟส 0.1 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 0.9 มิลลิลิตร ความเข้มขันสุดท้ายเป็น 0 25 50 100 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ปิเปตสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟสความเข้มขันต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายเอฟอาร์เอพีปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร

3. ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็น Blank ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4. สร้างกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟส

5. ปิเปตสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายเอฟอาร์เอพีปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร

6. เปรียบเทียบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต

3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu

3.11.1 เตรียมสารละลายโฟลิน–เซียคัลธู (Folin–Ciocalteu) 10% v/v

เตรียมสารละลายโฟลิน–เซียคัลธู โดยปิเปตสารละลายโฟลิน–เซียคัลธูมา 5.0000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.11.2 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) 7.5% w/v

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตมา 3.7575 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.11.3 การวิเคราะห์หาความยาวคลื่นของการทดสอบปฏิกิริยา

1) เตรียมสารละลายกรดแกลลิก ให้มีความเข้มข้น 20 พีพีเอ็ม โดยชั่งกรดแกลลิกมา 0.0002 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมททานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิมิตร

2) ปิเปตสารละลายโฟลิน–เซียคัลธู (ข้อ 3.10.1) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายกรดแกลลิก (ข้อ1) 0.2000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 4 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ข้อ 3.10.2) 0.4000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดที่เวลา 50–60 นาที จากนั้นใส่ในเซลล์บรรจุสารตัวอย่าง 1 เซลล์ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงช่วงความยาวคลื่น 500–800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็นเบสไลน์

3) ให้ทำการทดลองตาม ข้อ 2 ซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผลค่าความยาวคลื่นที่ได้จากการทดลองเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

3.11.4 การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

1) ปิเปตสารละลายโฟลิน–ซียคัลธู ข้อ 3.5.1 1.000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายกรดแกลลิก ข้อ1 จาก 3.9.3 0.2000 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 4 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ข้อ 3.9.2 0.4000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดที่เวลา 0 10 20 30 40 50 และ 60 นาที

2) นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbane) ของแต่ละช่วงเวลา ที่ความยาวคลื่น 769 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโตมิเตอร์ ซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้เมทานอลเป็น Blank บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง พล๊อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยกับเวลา

3.11.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก(Gallic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (Stock Solution) โดยชั่งกรดแกลลิกมา 0.0102 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมททานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock Soiution) ให้มีความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 พีพีเอ็ม โดยปิเปตสารละลายจาก (Stock Solution) มา 0.0000 0.1000 0.2000 0.3000 0.4000 และ 0.5000 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมททานอล

3.11.6 เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

เตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวัน ให้มีความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม โดยชั่งสารสกัดหัวแก่นตะวัน 0.0008 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.11.7 วิธีการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม

1) ปิเปตสารละลายโฟลิน–เซียคัลธู ข้อ 3.9.1 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 4 นาทีจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ข้อ 3.9.2 0.4000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาอีก 50 นาที

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง(Absorbance)ที่ความยาวคลื่น 769 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมททานอลเป็น Blank

3) สำหรับสารละลายแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

และสารสกัดหัวแก่นตะวันจากเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม ให้ทำการทดลองตามข้อ 1–2 ซ้ำ 3 ครั้ง/1 ชุด (สารมาตรฐานและสารตัวอย่างให้ทดสอบในวันเดียวกัน) บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงไปพล๊อตกราฟเพื่อคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมต่อไป (ให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด)

3.12 ข้อแนะนำ

1) ก่อนชั่งสารทดสอบ ควรตรวจเช็คเครื่องชั่งสารให้มีความเที่ยงตรง โดยตรวจจากฟองอากาศที่เครื่องชั่งสารให้ฟองอากาศอยู่ภายในวงกลมทุกครั้งก่อนใช้งาน

2) การชั่งน้ำหนักสารทดสอบ ควรใช้เครื่องชั่งสารเครื่องเดิมในการชั่งน้ำหนักสารทดสอบ

3) การชั่งน้ำหนักสารทดสอบที่เก็บอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำ (ตู้เย็น) ก่อนนำสารทดสอบมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ให้สารทดสอบอยู่ในอุณหภูมิห้องก่อนจึงค่อยชั่งน้ำหนักสารทดสอบ

4) หลังใช้สารทดสอบควรปิดฝาบรรจุภัณฑ์ให้สนิท

5) การวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงให้วิเคราะห์ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำไปหาตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูง โดยไม่ต้องทำความสะอาดเซลล์บรรจุสารตัวอย่างด้วยทำละลาย

6) สำหรับการทดสอบสารที่มีความไวต่อแสง ให้ควบคุมปริมาณแสงในห้องปฏิบัติการให้ได้มากที่สุด เพื่อควบคุมปัจจัยการเกิดอนุมูลอิสระจากแสงภายในห้อง

7) การเขย่าสารทดสอบ ให้นับจำนวนครั้งในการเขย่า โดยมีอัตราเร็วและจำนวนครั้งที่เท่ากันเสมอ

8) การปิเปตสารทดสอบด้วยไมโครปิเปต โดยให้ไมโครปิเปตทิปสัมผัสกับข้างหลอดทดลองทุกครั้งเสมอ เพื่อป้องกันสารในหลอดทดลองกระเด็นขึ้นสัมผัสไมโครปิเปตทิปอาจทำให้เกิดการเจือปนของสารได้ และป้องกันการเกิด ปฏิกิริยารุนแรงจากปฏิกิริยาของสารทดสอบที่อาจกระเด็นออกมาได้

9) การทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องแก้ว หลังจากทำความสะอาดแล้วให้ล้างด้วยน้ำ RO หรือ DI เพื่อควบคุมตัวรบกวนจาการสารชนิดอื่นที่อาจตกค้างอยู่ เช่น น้ำยาล้างจาน ฯลฯ

10) การทำความสะอาดเซลล์บรรจุสารตัวอย่างในการทดสอบบ้างปฏิกิริยาอาจทำให้เกิดคราบ ฝ้า ที่เซลล์บรรจุสารตัวอย่างได้ โดยแช่ด้วยกรดไนตริก 1 เปอร์เซ็นต์ จนออกแล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดหัวแก่นตะวันในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท

งานวิจัยครั้งนี้ได้สกัดหัวแก่นตะวันด้วยวิธีการแช่ (Maceration) ซึ่งใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvents) ก็คือ เอทานอล 70% โดยนำหัวแก่นตะวันมาสับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปผึ่งลมจนแห้ง จากนั้นจึงนำมาทำการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70% เมื่อได้สารละลายสกัดแล้วจึงนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดันจะได้สารสกัดหัวแก่นตะวัน นำมาทำการสกัดแยกอีกครั้งด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทนำสารสกัดเอทิลอะซีเตทมาทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดันเพื่อให้ได้สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท จากนั้นทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของสารสกัดหัวแก่นตะวันเมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง

ตาราง 2 แสดงผลน้ำหนักของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน (กิโลกรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (กรัม)	Yield (% w/w)
เอทิลอะซีเตท	1.0000	6.2000	0.62

4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวัน ที่สกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ซึ่งใช้วิตามินซี บีเอชเอ เป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงไปคำนวนหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) เพื่อนำไปพล๊อตกราฟหาค่า IC_{50}

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ แสดงดังตาราง 3-5 7-9 และ 11-13 ตามลำดับ

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) ของสารมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด แสดงดังตาราง 6 10 และ 14 ตามลำดับ

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น และกราฟมาตรฐาน ของสารมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย แสดงดังภาพ 9-10 11-12 และ 13-14 ตามลำดับ

ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH แสดงดังตาราง 15

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ย 1	±SD
Control	1.6561	1.6559	1.6568	1.6563	0.0005
2.5	1.2054	1.2058	1.2060	1.2057	0.0003
5	1.1828	1.1834	1.1822	1.1828	0.0006
10	1.0444	1.0448	1.0444	1.0445	0.0002
20	0.7272	0.7267	0.7266	0.7268	0.0003
40	0.0586	0.0585	0.0596	0.0589	0.0006
80	0.0479	0.0477	0.0473	0.0476	0.0003
160	0.0503	0.0506	0.0507	0.0505	0.0002
320	0.0476	0.0485	0.0480	0.0480	0.0005
640	0.0462	0.0469	0.0461	0.0464	0.0004

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 2)

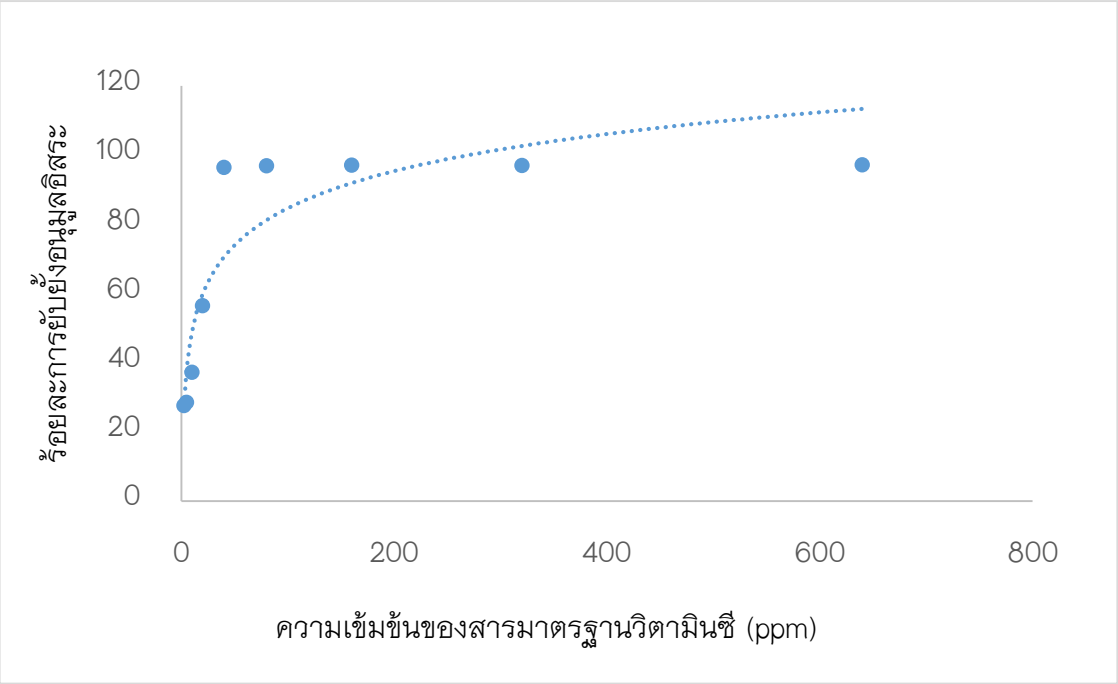
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ย 2	±SD
Control	1.6657	1.6656	1.6653	1.6655	0.0002
2.5	1.2021	1.2022	1.2026	1.2023	0.0003
5	1.1892	1.1892	1.1897	1.1894	0.0003
10	1.0445	1.0442	1.0447	1.0445	0.0003
20	0.7261	0.7276	0.7271	0.7269	0.0008
40	0.0605	0.0604	0.0600	0.0603	0.0003
80	0.0564	0.0575	0.0567	0.0568	0.0006
160	0.0473	0.0470	0.0475	0.0473	0.0002
320	0.0503	0.0506	0.0501	0.0503	0.0003
640	0.0484	0.0474	0.0477	0.0478	0.0005

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 3)

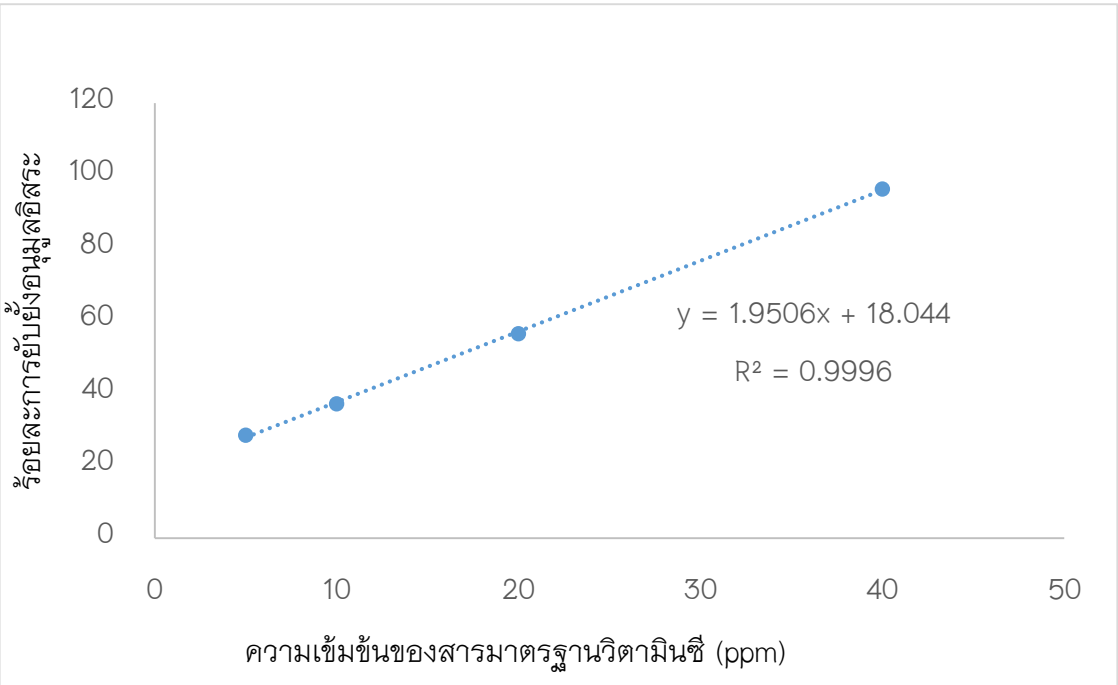
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.6674	1.6661	1.6676	1.6670	0.0008
2.5	1.2061	1.2060	1.2062	1.2061	0.0001
5	1.1948	1.1950	1.1951	1.1949	0.0002
10	1.0456	1.0461	1.0467	1.0461	0.0006
20	0.7203	0.7209	0.7203	0.7205	0.0004
40	0.0607	0.0606	0.0604	0.0606	0.0001
80	0.0500	0.0494	0.0507	0.0500	0.0006
160	0.0506	0.0501	0.0507	0.0505	0.0003
320	0.0514	0.0514	0.0500	0.0509	0.0008
640	0.0501	0.0495	0.0490	0.0495	0.0006

ตารางที่ 6 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซีที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด

ความเข้มข้น (ppm)	%Inhibition 1	%Inhibition 2	%Inhibition 3	%Inhibition เฉลี่ย	±SD
2.5	27.2042	27.8125	27.6515	27.5560	0.3152
5	28.5888	28.5890	28.3183	28.4987	0.1562
10	36.9378	37.2891	37.2466	37.1578	0.1918
20	56.1201	56.3554	56.7806	56.4187	0.3348
40	96.4469	96.3825	96.3677	96.3990	0.0421
80	97.1261	96.5876	96.9996	96.9044	0.2816
160	96.9500	97.1630	96.9736	97.0289	0.1168
320	97.1010	96.9799	96.9466	97.0092	0.0812
640	97.2016	97.1300	97.0296	97.1204	0.0864



ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซี กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย



ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซี กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.9679	1.9665	1.9682	1.9675	0.0009
2.5	1.2472	1.2475	1.2483	1.2477	0.0006
5	1.1367	1.1367	1.1362	1.1365	0.0003
10	0.9313	0.9319	0.9318	0.9316	0.0003
20	0.5406	0.5407	0.5409	0.5407	0.0002
40	0.2545	0.2547	0.2547	0.2546	0.0001
80	0.0750	0.0755	0.0755	0.0753	0.0003
160	0.0587	0.0584	0.0589	0.0587	0.0003
320	0.0565	0.0568	0.0565	0.0566	0.0002
640	0.0565	0.0577	0.0571	0.0571	0.0006

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 2)

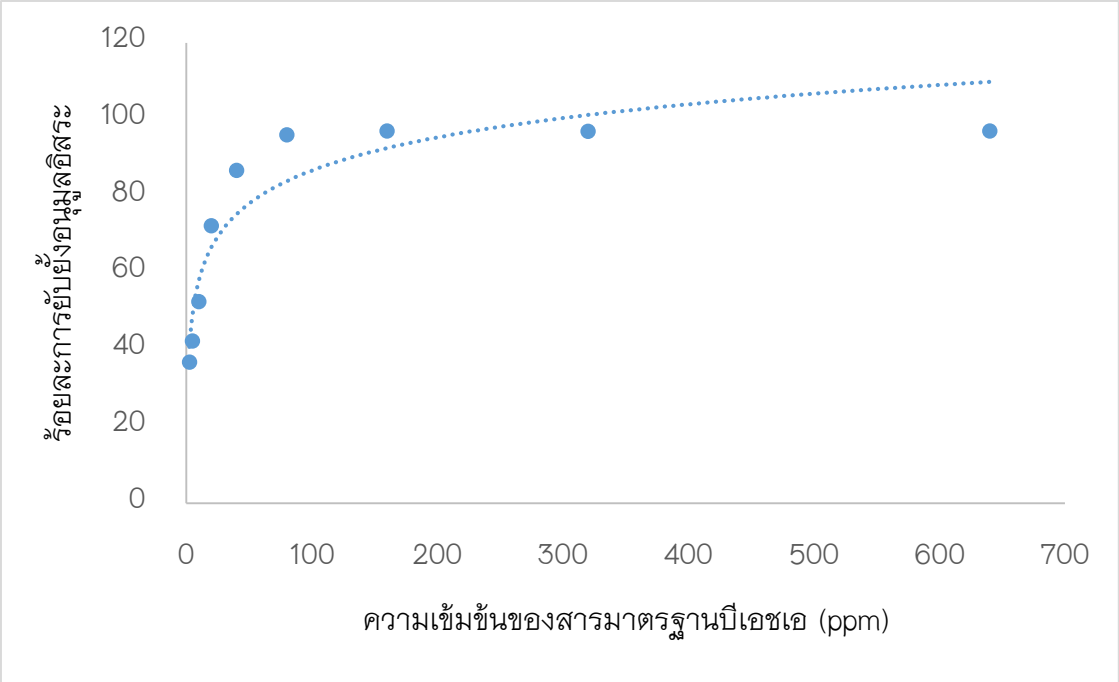
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.9681	1.9687	1.9691	1.9686	0.0005
2.5	1.2429	1.2427	1.2427	1.2428	0.0001
5	1.1370	1.1374	1.1378	1.1374	0.0004
10	0.9346	0.9341	0.9352	0.9346	0.0006
20	0.5423	0.5422	0.5429	0.5424	0.0004
40	0.2594	0.2597	0.2596	0.2595	0.0001
80	0.0776	0.0773	0.0774	0.0774	0.0002
160	0.0503	0.0505	0.0505	0.0504	0.0001
320	0.0595	0.0594	0.0582	0.0590	0.0007
640	0.0523	0.0528	0.0523	0.0524	0.0003

ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 3)

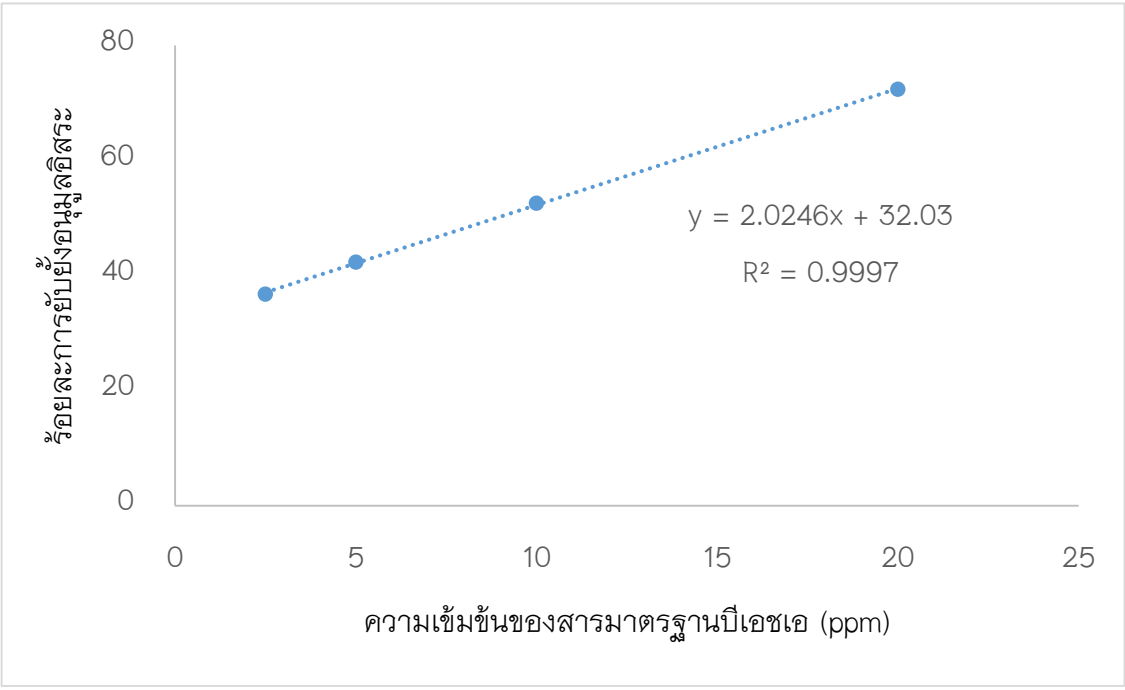
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ย 3	±SD
Control	1.9676	1.9678	1.9677	1.9677	0.0001
2.5	1.2415	1.2413	1.2414	1.2414	0.0001
5	1.1315	1.1316	1.1319	1.1316	0.0002
10	0.9346	0.9348	0.9349	0.9348	0.0002
20	0.5476	0.5478	0.5476	0.5476	0.0001
40	0.2643	0.2644	0.2645	0.2644	0.0001
80	0.0784	0.0784	0.0778	0.0782	0.0003
160	0.0639	0.0644	0.0640	0.0641	0.0003
320	0.0649	0.0643	0.0643	0.0645	0.0004
640	0.0605	0.0615	0.0623	0.0614	0.0009

ตารางที่ 10 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานบีเอชเอที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด

ความเข้มข้น (ppm)	%Inhibition 1	%Inhibition 2	%Inhibition 3	%Inhibition เฉลี่ย	±SD
2.5	36.5862	36.8714	36.9128	36.7901	0.1778
5	42.2363	42.2246	42.4895	42.3168	0.1497
10	52.6497	52.5238	52.4953	52.5563	0.0822
20	72.5167	72.4457	72.1697	72.3774	0.1833
40	87.0597	86.8164	86.5638	86.8133	0.2480
80	96.1711	96.0691	96.0267	96.0890	0.0742
160	97.0182	97.4381	96.7441	97.0668	0.3496
320	97.1249	97.0013	96.7229	96.9497	0.2059
640	97.0987	97.3374	96.8796	97.1052	0.2289



ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานบีเอชเอ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย



ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานบีเอชเอ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

ตารางที่ 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
Control	1.8953	1.8955	1.8957	1.8955	0.0002
5	1.2576	1.2579	1.2575	1.2577	0.0002
10	1.2499	1.2495	1.2492	1.2495	0.0004
20	1.1714	1.1718	1.1720	1.1717	0.0003
40	1.0980	1.0982	1.0989	1.0984	0.0005
80	0.8952	0.8954	0.8955	0.8954	0.0002
160	0.4453	0.4454	0.4450	0.4452	0.0002
320	0.0933	0.0932	0.0935	0.0933	0.0002
640	0.0805	0.0807	0.0811	0.0808	0.0003
1000	0.0783	0.0789	0.0784	0.0785	0.0003

ตารางที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 2)

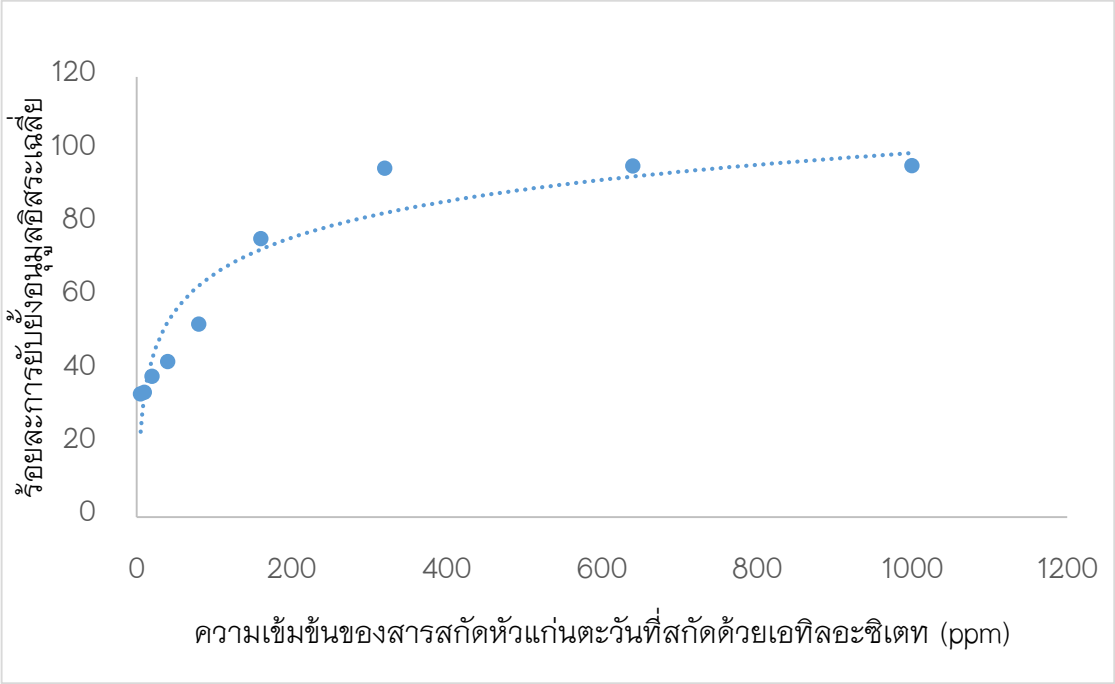
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
Control	1.8945	1.8948	1.8946	1.8946	0.0002
5	1.2583	1.2585	1.2587	1.2585	0.0002
10	1.2493	1.2490	1.2496	1.2493	0.0003
20	1.1710	1.1715	1.1713	1.1713	0.0003
40	1.0863	1.0865	1.0864	1.0864	0.0001
80	0.8944	0.8948	0.8942	0.8945	0.0003
160	0.4512	0.4510	0.4518	0.4513	0.0004
320	0.0920	0.0923	0.0922	0.0922	0.0002
640	0.0804	0.0805	0.0809	0.0806	0.0003
1000	0.0778	0.0771	0.0775	0.0775	0.0004

ตารางที่ 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH• (ชุด 3)

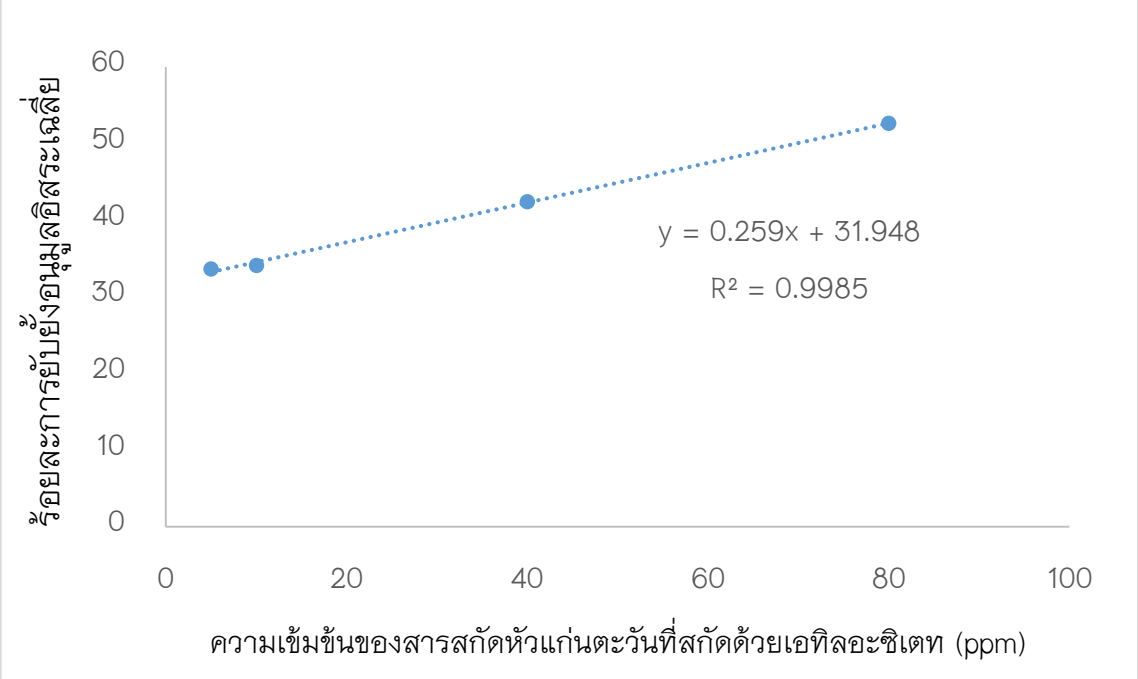
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.8843	1.8849	1.8847	1.8846	0.0003
5	1.2507	1.2509	1.2511	1.2509	0.0002
10	1.2414	1.2415	1.2418	1.2416	0.0002
20	1.1528	1.1526	1.1525	1.1526	0.0002
40	1.0845	1.0843	1.0844	1.0844	0.0001
80	0.8965	0.8963	0.8966	0.8965	0.0002
160	0.4697	0.4699	0.4686	0.4694	0.0007
320	0.0907	0.0913	0.0911	0.0910	0.0003
640	0.0784	0.0788	0.0789	0.0787	0.0003
1000	0.0789	0.0798	0.0781	0.0789	0.0009

ตารางที่ 14 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด

ความเข้มข้น (ppm)	%Inhibition 1	%Inhibition 2	%Inhibition 3	%Inhibition เฉลี่ย	±SD
5	33.6569	33.5744	33.6252	33.6188	0.0416
10	34.0859	34.0600	34.1204	34.0888	0.0303
20	38.1899	38.1787	38.8394	38.4027	0.3782
40	42.0601	42.6581	42.4599	42.3927	0.3046
80	52.7685	52.7886	52.4320	52.6631	0.2004
160	76.5135	76.1779	75.0929	75.9281	0.7425
320	95.0766	95.1353	95.1696	95.1272	0.0471
640	95.7395	95.7458	95.8240	95.7698	0.0471
1000	95.8573	95.9112	95.8117	95.8600	0.0498



ภาพที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย



ภาพที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

จากกราฟมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) จะได้สมการเส้นตรง y = mx + c แสดงดังภาพ 10 12 และ 14 ตามลำดับ จากนั้นนำค่า 50 แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (50% of inhibitiory concentration, IC_{50}) ในหน่วย ppm ของแต่ละสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ แสดงดังตาราง 15

ตาราง 15 แสดงค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ	ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) (ppm)
1. มาตรฐานวิตามินซี	16.38
2. มาตรฐานบีเอชเอ	8.88
3. สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท	69.70

4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ซึ่งใช้โทลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 753 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงนำไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) นำไปพล๊อตกราฟเพื่อคำนวณหาค่า TEAC

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ แสดงดังตาราง 16–18 19–21 22–24 และ 25–29 ตามลำดับ

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทลอกซ์ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด แสดงดังตาราง 28

กราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย แสดงดังภาพ 15

ค่า TEAC ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS แสดงดังตาราง 29

ตาราง 16 **แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 1)**

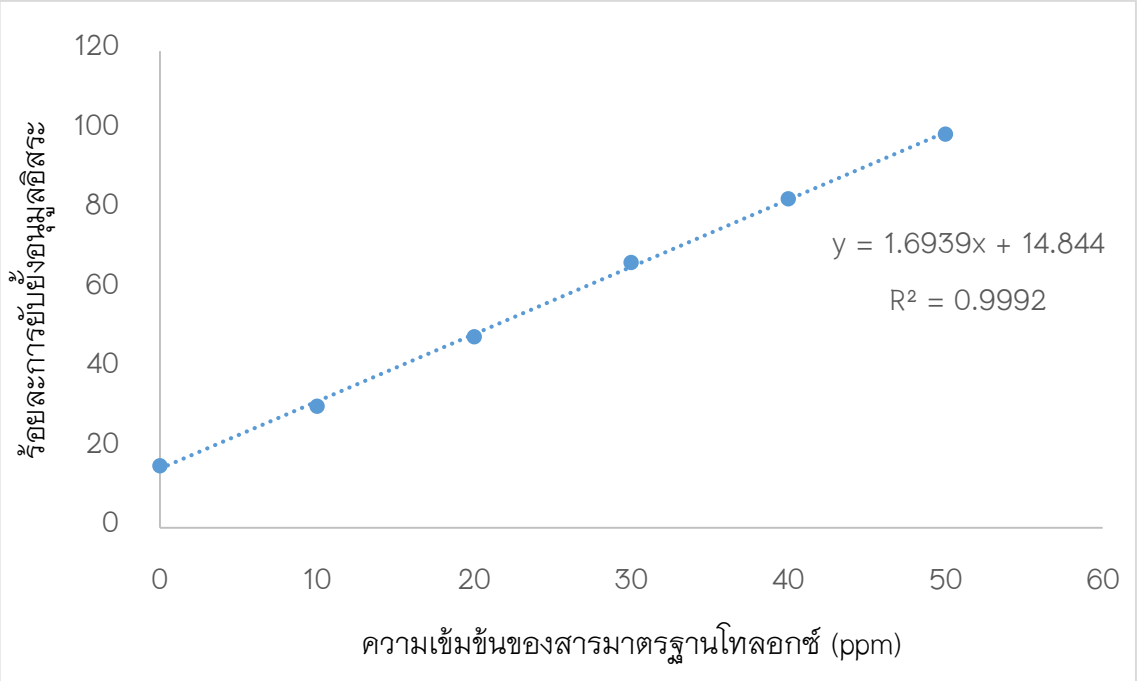
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.6831	0.6833	0.6838	0.6834	0.0004
0	0.5773	0.5775	0.5775	0.5774	0.0001
10	0.4715	0.4717	0.4716	0.4716	0.0001
20	0.3515	0.3514	0.3517	0.3515	0.0002
30	0.2331	0.2334	0.2337	0.2334	0.0003
40	0.1174	0.1175	0.1163	0.1170	0.0007
50	0.0055	0.0062	0.0062	0.0060	0.0004
60	0.0029	0.0040	0.0029	0.0032	0.0007

ตาราง 17 **แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 2)**

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.6860	0.6866	0.6862	0.6863	0.0003
0	0.5785	0.5787	0.5784	0.5785	0.0002
10	0.4733	0.4736	0.4733	0.4734	0.0002
20	0.3515	0.3520	0.3515	0.3516	0.0003
30	0.2248	0.2253	0.2254	0.2251	0.0003
40	0.1185	0.1180	0.1183	0.1183	0.0003
50	0.0057	0.0060	0.0062	0.0059	0.0003
60	0.0048	0.0057	0.0052	0.0052	0.0005

ตาราง 18 **แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ (ชุด 3)**

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.6892	0.6897	0.6897	0.6895	0.0003
0	0.5806	0.5812	0.5813	0.5810	0.0004
10	0.4846	0.4844	0.4846	0.4845	0.0001
20	0.3652	0.3648	0.3646	0.3649	0.0003
30	0.2250	0.2249	0.2254	0.2251	0.0002
40	0.1184	0.1177	0.1182	0.1181	0.0004
50	0.0062	0.0056	0.0059	0.0059	0.0003
60	0.0067	0.0070	0.0068	0.0068	0.0002



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

ตาราง 19 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
80	0.3325	0.3320	0.3323	0.3323	0.0003

ตาราง 20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 2)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
80	0.3376	0.3372	0.3380	0.3376	0.0004

ตาราง 21 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 3)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
80	0.3319	0.3313	0.3317	0.3316	0.0003

ตาราง 22 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
100	0.0032	0.0035	0.0032	0.0033	0.0002

ตาราง 23 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 2)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
100	0.0041	0.0038	0.0034	0.0038	0.0004

ตาราง 24 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 3)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
100	0.0040	0.0040	0.0045	0.0041	0.0003

ตาราง 25 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
100	0.0036	0.0034	0.0037	0.0036	0.0002

ตาราง 26 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 2)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
100	0.0033	0.0038	0.0034	0.0035	0.0002

ตาราง 27 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายบีเอชเอ ทำปฏิกิริยากับ ABTS$^{\bullet+}$ (ชุด 3)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
100	0.0033	0.0034	0.0034	0.0034	0.0001

ตาราง 28 **แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทลอกซ์ และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท สารละลายวิตามินซี และสารละลายบีเอชเอ ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด**

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			%Inhibition 1	%Inhibition 2	%Inhibition 3	%Inhibition เฉลี่ย	±SD
	เฉลี่ย 1	เฉลี่ย 2	เฉลี่ย 3					
Control	0.6834	0.6863	0.6895	–	–	–	–	–
0	0.5774	0.5785	0.5810	15.5058	15.7074	15.7336	15.6489	0.1247
10	0.4716	0.4734	0.4845	30.9994	31.0263	29.7293	30.5850	0.7412
20	0.3515	0.3516	0.3649	48.5636	48.7639	47.0848	48.1374	0.9171
30	0.2334	0.2251	0.2251	65.8472	67.1985	67.3556	66.8004	0.8292
40	0.1170	0.1183	0.1181	82.8773	82.7699	82.8789	82.8420	0.0625
50	0.0060	0.0059	0.0059	99.1269	99.1379	99.1467	99.1372	0.0099
60	0.0032	0.0052	0.0068	99.5269	99.2423	99.0138	99.2610	0.2571
เอทิลอะซีเตท 80	0.3323	0.3376	0.3316	51.3755	50.8087	51.9023	51.3622	0.5470
วิตามินซี 100	0.0033	0.0038	0.0041	99.5220	99.4512	99.4005	99.4579	0.0610
บีเอชเอ 100	0.0036	0.0035	0.0034	99.4805	99.4924	99.5141	99.4957	0.0170

จากกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิระเฉลี่ย จะได้สมการเส้นตรง y = mx + c แสดงดังภาพ 15 จากนั้นนำค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย ต่อน้ำหนักสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ในหน่วยมิลลิโมลาร์ แสดงดังตาราง 29

ตาราง 29 แสดงผลค่า TEAC ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ	ค่า TEAC (mM)
1.วิตามินซี	7.7842
2.บีเอชเอ	7.7866
3.สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท	5.0128

4.4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวัน ที่ทำการสกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายในการสกัด คือ เอทิลอะซีเตท ซึ่งนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP ซึ่งใช้เฟอร์รัสซัลเฟตเป็นสารมาตรฐาน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง นำไปพล๊อตกราฟเพื่อคำนวนหาปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตและสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) แสดงดังตาราง 30–32 และ 33–35 ตามลำดับ

ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) แสดงดังตาราง 36

กราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม แสดงดังภาพ 16

ค่าผลการคำนวณค่า FRAP values ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม โดยใช้วิธี FRAP assay แสดงดังตาราง 37

ตาราง 30 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ทำปฏิกิริยาสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) ทีพีทีแซต (TPTZ) (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	1	2	3		
0	0.1081	0.1076	0.1091	0.1079	0.0008
25	0.1845	0.1853	0.1840	0.1849	0.0007
50	0.3231	0.3228	0.3232	0.3230	0.0002
100	0.4718	0.4720	0.4722	0.4719	0.0002
200	1.0522	1.0523	1.0520	1.0523	0.0002
400	2.0648	2.0649	2.0654	2.0648	0.0003

ตาราง 31 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ทำปฏิกิริยาสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) ทีพีทีแซต (TPTZ) (ชุด 2)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	1	2	3		
0	0.1075	0.1077	0.1076	0.1076	0.0001
25	0.1889	0.1899	0.1894	0.1894	0.0005
50	0.3190	0.3189	0.3186	0.3188	0.0002
100	0.5854	0.5847	0.5845	0.5849	0.0005
200	1.0523	1.0517	1.0531	1.0524	0.0007
400	2.0626	2.0613	2.0615	2.0618	0.0007

ตาราง 32 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ทำปฏิกิริยาสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) ทีพีทีแซต (TPTZ) (ชุด 3)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	1	2	3		
0	0.1081	0.1082	0.1080	0.1081	0.0001
25	0.1885	0.1880	0.1883	0.1883	0.0003
50	0.3256	0.3272	0.3270	0.3266	0.0009
100	0.5940	0.5924	0.5937	0.5934	0.0009
200	1.0525	1.0536	1.0525	1.0529	0.0006
400	2.0681	2.0651	2.0691	2.0674	0.0021

ตาราง 33 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	1	2	3		
80	1.5348	1.5375	1.5219	1.5314	0.0083

ตาราง 34 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) (ชุด 2)

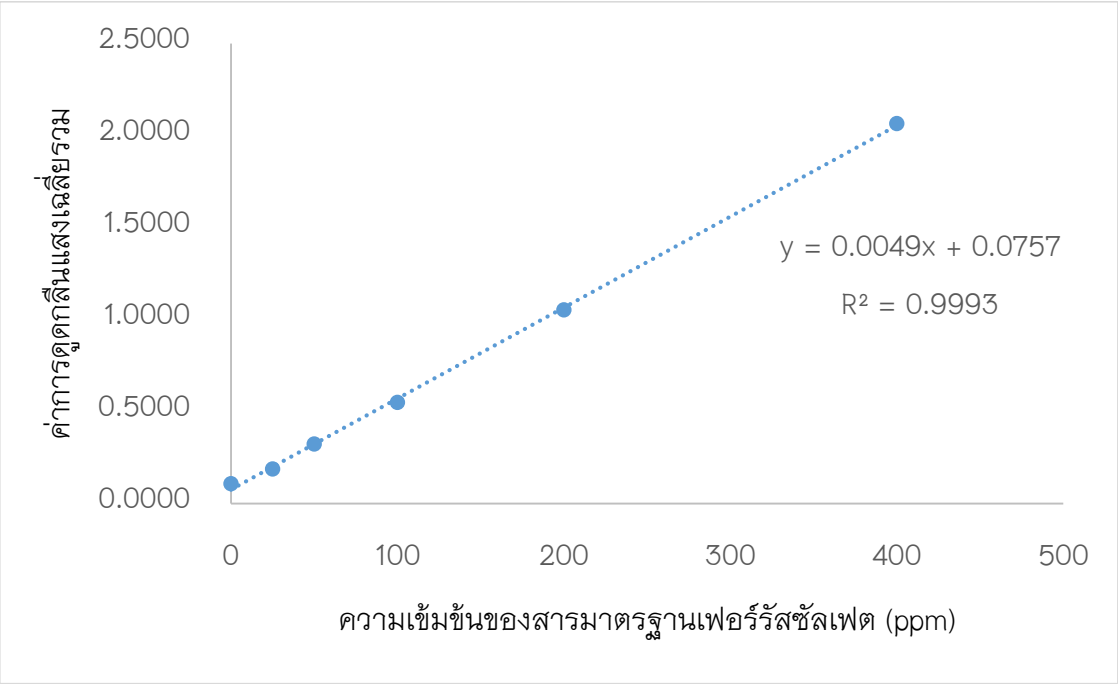
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	1	2	3		
80	1.5989	1.5913	1.5961	1.5954	0.0038

ตาราง 35 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP) (ชุด 3)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	1	2	3		
80	1.5314	1.5219	1.5235	1.5256	0.0051

ตาราง 36 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลายเอฟอาร์เอพี (FRAP)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม	±SD
	เฉลี่ย 1	เฉลี่ย 2	เฉลี่ย 3		
0	0.1079	0.1076	0.1081	0.1079	0.0003
25	0.1849	0.1894	0.1883	0.1875	0.0023
50	0.3230	0.3188	0.3266	0.3228	0.0039
100	0.4719	0.5849	0.5934	0.5500	0.0678
200	1.0523	1.0524	1.0529	1.0525	0.0003
400	2.0648	2.0618	2.0674	2.0647	0.0028
เอทิลอะซีเตท 80	1.5314	1.5954	1.5256	1.5508	0.0388



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม

จากกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม โดยความยาวคลื่นที่ใช้คือ 596 นาโนเมตร และความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 0 25 50 100 200 และ 400 พีพีเอ็ม แล้วนำข้อมูลที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต แสดงดังภาพ 17 ซึ่งจะมีสมการเส้นตรงคือ y = mx + c

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท แทนในค่า y ในสมการ เพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็น FRAP values ในหน่วยพีพีเอ็ม แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า FRAP values ในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด แสดงดังตาราง 45

ตาราง 37 แสดงผลการคำนวณค่า FRAP values ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม โดยใช้วิธี FRAP assay

สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ	**FRAP values**	**FRAP values ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง (mg Fe/g Dw)**
สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท	301.0408	2.3331

4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocateu

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocateu ซึ่งใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 769 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงนำไปพล๊อตกราฟเพื่อคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocateu แสดงดังตาราง 38–40 และ 41–43 ตามลำดับ

ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocateu แสดงดังตาราง 44

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม แสดงดังภาพ 17

ค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocateu แสดงดังตาราง 45

ตารางที่ 38 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.0652	0.0651	0.0661	0.0655	0.0006
20	0.2640	0.2670	0.2690	0.2667	0.0025
40	0.4693	0.4695	0.4691	0.4693	0.0002
60	0.6874	0.6877	0.6873	0.6875	0.0002
80	0.9006	0.9010	0.9009	0.9008	0.0002
100	1.0769	1.0770	1.0771	1.0770	0.0001

ตารางที่ 39 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 2)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.0655	0.0659	0.0658	0.0657	0.0002
20	0.2871	0.2872	0.2872	0.2872	0.0001
40	0.4753	0.4752	0.4751	0.4752	0.0001
60	0.6764	0.6762	0.6761	0.6762	0.0002
80	0.9018	0.9016	0.9022	0.9019	0.0003
100	1.0879	1.088	1.0881	1.0880	0.0001

ตารางที่ 40 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 3)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.0657	0.0655	0.0654	0.0655	0.0002
20	0.2421	0.2419	0.242	0.2420	0.0001
40	0.4513	0.4515	0.4512	0.4513	0.0002
60	0.6924	0.6926	0.6925	0.6925	0.0001
80	0.9102	0.9115	0.912	0.9112	0.0009
100	1.0649	1.065	1.0652	1.0650	0.0002

ตาราง 41 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
80	0.1727	0.1725	0.1728	0.1727	0.0002

ตาราง 42 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 2)

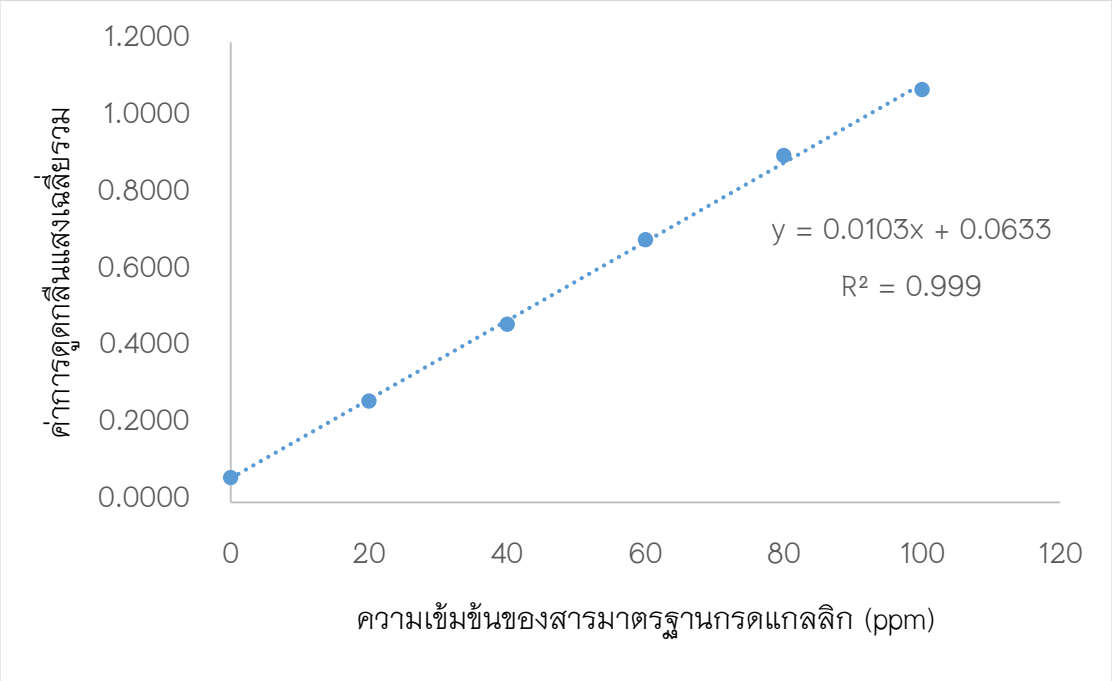
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
80	0.1606	0.1607	0.1607	0.1607	0.0001

ตาราง 43 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตททำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu (ชุด 3)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
80	0.1832	0.1834	0.1837	0.1834	0.0003

ตาราง 44 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม	±SD
	เฉลี่ย 1	เฉลี่ย 2	เฉลี่ย3		
0	0.0655	0.0657	0.0655	0.0656	0.0001
20	0.2667	0.2872	0.2420	0.2653	0.0226
40	0.4693	0.4752	0.4513	0.4653	0.0124
60	0.6875	0.6762	0.6925	0.6854	0.0083
80	0.9008	0.9019	0.9112	0.9046	0.0057
100	1.0770	1.0880	1.0650	1.0767	0.0115
เอทิลอะซีเตท 80	0.1727	0.1607	0.1834	0.1723	0.0114



ภาพที่ 17 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม

จากราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม จะได้สมการเส้นตรง y = mx + c แสดงดังภาพ 16 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย พีพีเอ็ม แล้วนำค่าปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย พีพีเอ็ม ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดดังตาราง 37

ตาราง 45 แสดงผลค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin–Ciocalteu

สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ	ปริมาณฟีนอลิกรวม (ppm)	ปริมาณฟีนอลิกรวมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g DW)
สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท	10.5825	0.8201

4.5 อภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH จากค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของมาตรฐานวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม และสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม โดยคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากสมการเส้นตรง $y = mx + c$ ดังนี้ มาตรฐานวิตามินซีเท่ากับ 16.38 ($y = 2.0246x + 32.03$; $R^2 = 0.9997$) สารสกัดเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 69.70 ($y = 0.259x + 31.948$; $R^2 = 0.9985$) โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ที่มีค่าน้อยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน มาตรฐานบีเอชเอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ามาตรฐานวิตามินซี เนื่องจากมาตรฐานบีเอชเอมีโครงสร้างของสารที่สามารถให้อนุมูลไฮโดรเจนได้ง่ายเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระจึงทำให้ลดอัตราการเกิดออกซิเดชันได้มากกว่ามาตรฐานวิตามินซี และรองลงมา คือ สารสกัดเอทิลอะซีเตท

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS จากค่า TEAC ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม และสารละลายวิตามินซี บีเอชเอ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม โดยคำนวณค่า TEAC จากสมการเส้นตรง $y = 1.6939x + 14.844$; $R^2 = 0.9992$ ของกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ ดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 5.0128 มิลลิโมลาร์ วิตามินซี เท่ากับ 7.7842 มิลลิโมลาร์ และบีเอชเอ เท่ากับ 7.7866 มิลลิโมลาร์ โดยพิจารณาจากค่า TEAC ที่มีค่ามากจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่า บีเอชเอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซี รองลงมาคือ สารสกัดเอทิลอะซีเตท

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยวิธี FRAP assay ซึ่งใช้เฟอร์รัสซัลเฟต เป็นสารมาตรฐาน โดยการสกัดหัวแก่นตะวันด้วยวิธีสกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายคือ เอทิลอะซีเตท ที่มีความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม โดยมีการคำนวณหาค่า FRAP values จากสมการเส้นตรง $y = 0.0049x + 0.0757$; $R^2 = 0.9993$ ของกราฟมาตรฐานซัลเฟต ดังนี้ ค่า FRAP values ที่ได้จากสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 301.0408 พีพีเอ็ม จากนั้นจึงคำนวณหาค่า FRAP values ในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนี้ สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 2.3331 mg GAE/g DW ซึ่งเป็นค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocateu จากค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม โดยคำนวณค่าปริมาณฟีนอลิกรวม จากสมการเส้นตรง $y = 0.0103x + 0.0633$; $R^2 = 0.999$ ของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 10.5825 พีพีเอ็ม แล้วนำค่าปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย พีพีเอ็ม ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย มิลลิกรัม ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 0.8201 mg GAE/g DW

ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH ABTS FRAP assay และปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocateu พบว่า สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้น้อย และมีปริมาณฟีนอลิกน้อย ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่าสารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อย เนื่องจาก ตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำ จะส่งผลให้การสกัดองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดของกลุ่มสารที่มีขั้วต่ำออกมาด้วย จึงทำให้ได้กลุ่มสารจำพวกสารประกอบฟีนอลิกน้อย จึงสรุปได้ว่า การเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำมีผลต่อการวิเคราะห์ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม เพราะกลุ่มสารฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มที่สำคัญซึ่งมีคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินวิจัย

5.1 สรุปผลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม

จากการสกัดหัวแก่นตะวันด้วยวิธีการแช่ (Macerration) ในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) นั่นคือ เอทานอล 70% และนำมาทำการแยกชั้นให้เป็นชั้น เอทิลอะซีเตท แล้วนำมาวิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH แสดงผลค่า IC_{50} ดังนี้ มาตรฐานวิตามินซี เท่ากับ 16.38 พีพีเอ็ม มาตรฐานบีเอชเอ เท่ากับ 8.88 พีพีเอ็ม และสารสกัดเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 69.70 พีพีเอ็ม โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อยจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบสารละลาย สารมาตรฐานบีเอชเอจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ มาตรฐานวิตามินซี และสารสกัดเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS แสดงผลค่า TEAC ซึ่งคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 5.0128 มิลลิโมลาร์ วิตามินซี เท่ากับ 7.7842 มิลลิโมลาร์ และบีเอชเอเท่ากับ 7.7866 มิลลิโมลาร์ โดยพิจารณาจากค่า TEAC ที่มีค่ามากจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่าเมื่อเปรียบเทียบสารละลาย บีเอชเอมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ วิตามินซี และสารสกัดเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวัน โดยวิธี FRAP assay ค่า FRAP values ที่ได้จากสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 301.0408 พีพีเอ็ม จากนั้นคำนวณหาค่า FRAP value ในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ เท่ากับ 2.3331 mg GAE/g DW

จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocateu ซึ่งแสดงผลค่าปริมาณฟีนอลิกรวม (mg) ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ ซึ่งคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซีเตท เท่ากับ 0.8201 mg GAE/g DW

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการสกัดหัวแก่นตะวันควรจะทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ความมีขั้วต่างกันเพื่อนำมาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการหาปริมาณฟีนอลิกรวม

2. ในการสกัดสารควรทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ออกมา แล้วนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้มากขึ้น และผลที่ได้มีความถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้น

3. ควรทำการศึกษาวิธีการสกัดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษ และได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพเหมาะแก่การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

[1] อนุมูลอิสระ เข้าได้ถึงจาก http-lw1g-pro.comlweboord

[2] ปณัฐฐา ไชยมุติ. (2547), การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร 7 ชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.1-13 น.

[3] กรมป่าไม้. (2544). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันทน์. กรุงเทพฯ: ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้สำนักวิชาการป่าไม้. 56-57 น.

[4] จุไรรัตน์ รัตนพันธ์ (2547). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดจากลำต้นชะลูด. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. วิทยาศาสตร์(เทคโนโลยีชีวภาพ). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บัณฑิตวิทยาลัย.

[5] แหล่งเรียนรู้ข้อมูลสมุนไพรเพื่อเกษตรไทย. แก่นตะวัน (17 ธันวาคม 2559). สืบค้นเมื่อ 28 มีนาคม 2562, จาก: https://puechkaset.com.

[6] แก่นตะวัน เข้าได้ถึงจาก https://puechkaset.com/แก่นตะวัน/

[7] แก่นตะวัน เข้าได้ถึงจาก https://medthai.com/แก่นตะวัน/

[8] ประโยชน์ สรรพคุณ และข้อมูลวิจัยแก่นตะวัน เข้าถึงได้จาก https://www.disthai.com/17049606/แก่นตะวัน

[9] รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การเตรียมตัวอย่างพืช: การคัดเลือกพืชสมุนไพร, ประเภทของพืช, การทำสมุนไพรให้แห้ง, การแตกย่อยเนื้อเยื่อ, การสกัดสาระสำคัญจากพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

บรรณานุกรม (ต่อ)

[10] เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการ. มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. หน้า 62–64.

[11] อธิป สกุลเผือก. 2559. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา

[12] บุหรัน พันธุสวรรค์. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และวิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ. วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยพะเยา. พะเยา

[13] สุรพงศ์ รัตนะ และบันลือ สังข์ทอง. 2559. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้หอมห้าชนิด. คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. มหาสารคาม

[14] ปิยนุช เจริญผล และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง. 2558. การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของการสกัดและปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบดาวเรือง. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม. พิษณุโลก

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

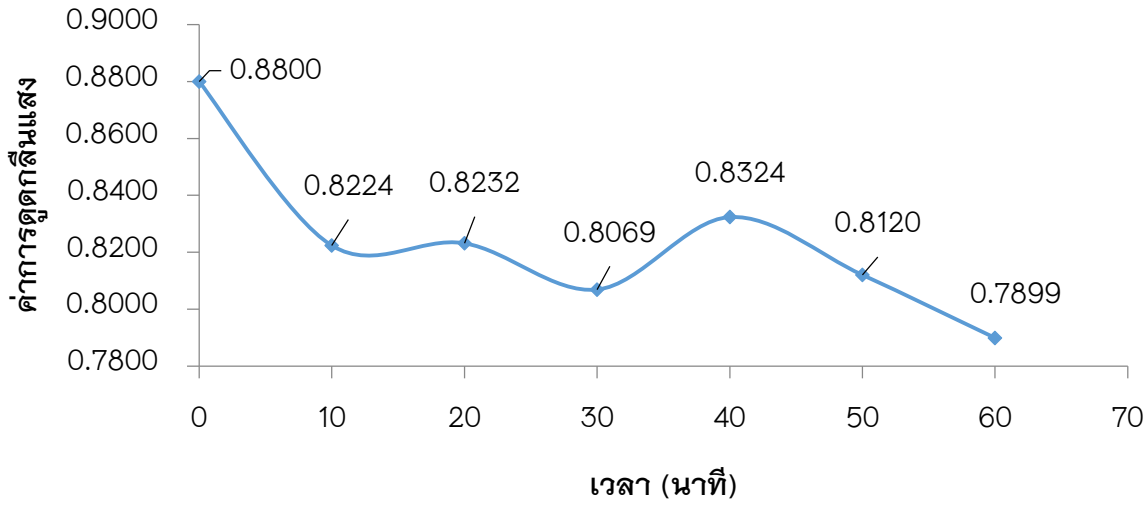
การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

1. ผลการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี DPPH

การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา แต่ละช่วงของเวลาตั้งแต่เวลาที่ 0 10 20 30 40 50 และ 60 นาที พล๊อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยกับเวลา จุดต่ำสุดของกราฟคือตำแหน่งของเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

ตาราง ก1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละช่วงเวลาที่ได้จากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี DPPH

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.8795	0.8872	0.8733	0.8800	0.0070
10	0.7908	0.8304	0.8459	0.8224	0.0284
20	0.8356	0.8222	0.8117	0.8232	0.0120
30	0.8159	0.8027	0.8021	0.8069	0.0078
40	0.8266	0.8393	0.8312	0.8324	0.0064
50	0.822	0.8128	0.8013	0.8120	0.0104
60	0.8016	0.7898	0.7783	0.7899	0.0117



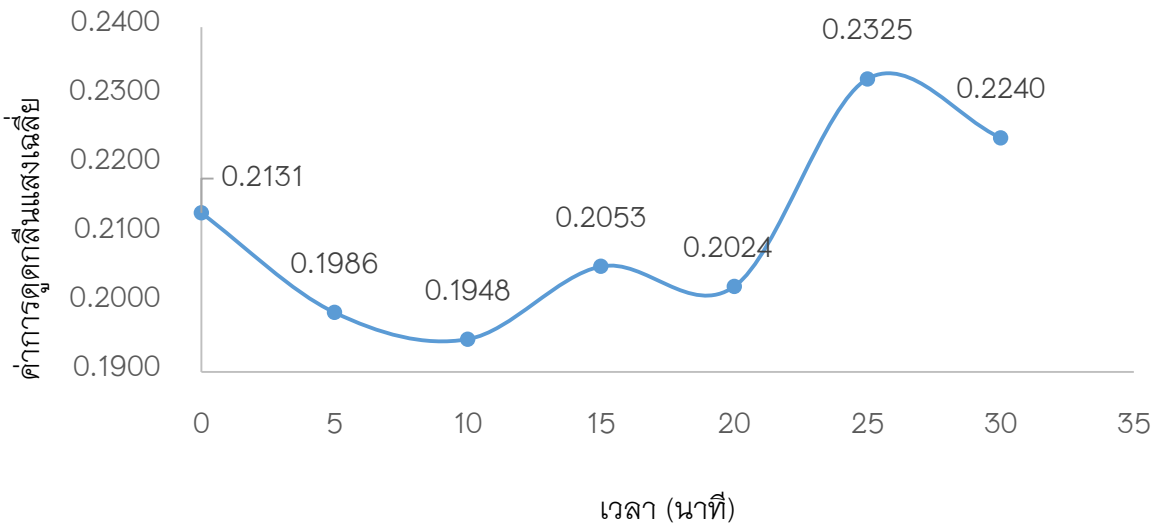
ภาพที่ ก1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี DPPH

2. ผลการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา ABTS

การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา แต่ละช่วงของเวลาตั้งแต่เวลาที่ 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที พล๊อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยกับเวลา จุดต่ำสุดของกราฟคือตำแหน่งของเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

ตาราง ก2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละช่วงเวลาที่ได้จากการวิเคราะห์เวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี ABTS

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.2121	0.2197	0.2074	0.2131	0.0062
5	0.1963	0.1982	0.2014	0.1986	0.0026
10	0.1894	0.1973	0.1977	0.1948	0.0047
15	0.2067	0.2087	0.2006	0.2053	0.0042
20	0.1992	0.2037	0.2043	0.2024	0.0028
25	0.2323	0.2421	0.2232	0.2325	0.0095
30	0.2164	0.2286	0.2269	0.2240	0.0066



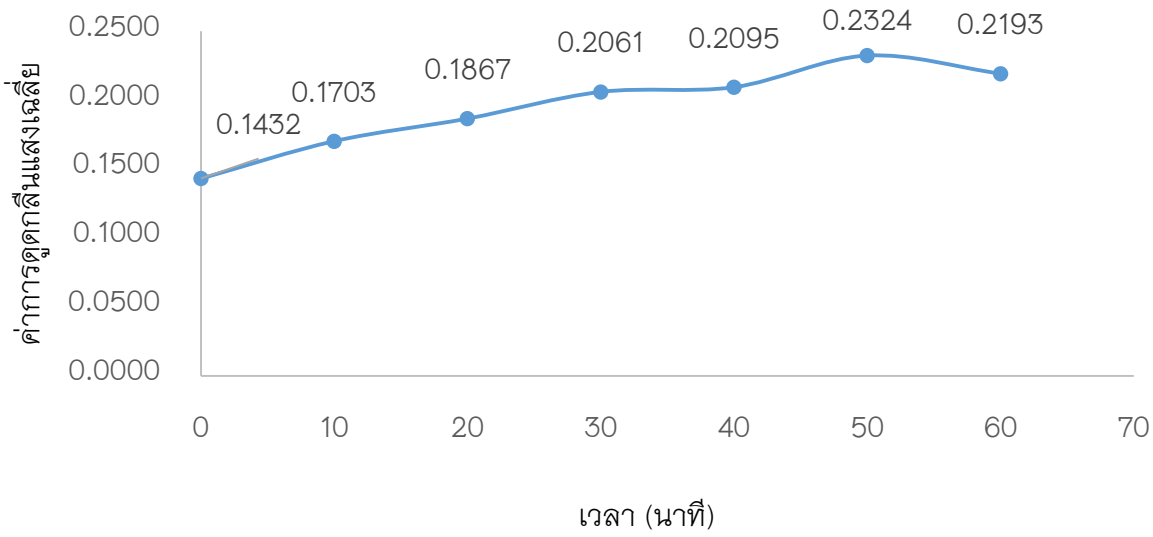
ภาพที่ ก2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสง จากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี ABTS

3. ผลการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาวิธี Folin–Ciocate

การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา แต่ละช่วงของเวลาตั้งแต่เวลาที่ 0 10 20 30 40 50 และ 60 นาที พล๊อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยกับเวลา จุดสูงสุดของกราฟคือตำแหน่งของเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา

ตาราง ก3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละช่วงเวลาที่ได้จากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยา Folin–Ciocateu

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสง	±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	0.1355	0.1445	0.1497	0.1432	0.0072
10	0.1667	0.1731	0.1712	0.1703	0.0033
20	0.1850	0.1859	0.1893	0.1867	0.0023
30	0.1994	0.2096	0.2092	0.2061	0.0058
40	0.2045	0.2117	0.2123	0.2095	0.0043
50	0.2290	0.2334	0.2349	0.2324	0.0031
60	0.2214	0.2209	0.2157	0.2193	0.0031



ภาพที่ ก3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าการดูดกลืนแสง จากการวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมวิธี Folin–Ciocateu

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการคำนวณ

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

จาก

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

ตัวอย่างการคำนวณ

จงเตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวัน ให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

แสดงว่า

เมทานอล 1,000 มิลลิลิตร มีสารสกัดหัวแก่นตะวัน 1,000 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 25 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดหัวแก่นตะวันเท่ากับ

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

$$= \frac{25\ mg}{1{,}000}$$

$$= 0.0250\ g$$

ดังนั้น

การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหัวแก่นตะวัน ให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม จะต้องชั่งสารสกัดหัวแก่นตะวัน 0.0250 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. การคำนวณหาน้ำหนักสาร (g) จากหน่วยมิลลิโมล (mM)

จากสูตร

$$n = \frac{g}{Mw} = \frac{CV}{1,000}$$

เมื่อ

n	คือ	จำนวนโมลของตัวละลาย
C	คือ	ความเข้มข้น หน่วย โมล/ลิตร
V	คือ	ปริมาตรของสารละลาย หน่วย มิลลิลิตร
Mw	คือ	มวลโมเลกุลของตัวละลาย หน่วย กรัม/โมล
g	คือ	มวลของสาร หน่วย กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

จงเตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร (มวลโมเลกุล เท่ากับ 548.68 กรัม/โมล)

วิธีทำ

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

$$= \frac{(7\times10^{-3}\ \cancel{mol/L})(10\ \cancel{ml})(548.68\ g/\cancel{mol})}{1,000\ \cancel{ml/L}}$$

$$= 0.0384\ g$$

ดังนั้น

การเตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ จะต้องชั่งสาร ABTS มา 0.0384 กรัม (ต้องคิดเปอร์เซ็นต์ ASSAY ตามบรรจุภัณฑ์ก่อนจึงจะถูกต้อง) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3. การคำนวณหาน้ำหนักสารที่แท้จริง (g) จากค่าเปอร์เซ็น ASSAY ตามบรรจุภัณฑ์

จาก

ผลการคำนวณข้อ 2 จะได้น้ำหนักของสาร ABTS มา 0.0384 กรัม

เมื่อ

น้ำหนักของสาร ABTS ตามบรรจุภัณฑ์มีค่า ASSAY ≥ 98.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักของสาร ABTS ค่าเปอร์เซ็นต์ ASSAY ไม่เต็ม 100 เปอร์เซ็นต์)

ตัวอย่างการคำนวณ

แสดงว่า

ค่า ASSAY 98.0 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักของสาร ABTS 0.0384 กรัม

ถ้า ค่า ASSAY 100 เปอร์เซ็นต์ จะมีน้ำหนักของสาร ABTS เท่ากับ

$$= \frac{(100\ \%)(0.0384\ g)}{98.0\ \%}$$

$$= 0.0392\ g$$

ดังนั้น

การเตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ จะต้องชั่งสาร ABTS มา 0.0392 กรัม จึงจะถูกต้อง

4. 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

จากสารละลายสารสกัดหัวแก่นตะวัน ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 640 พีพีเอ็ม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1{,}000 \text{ ppm})(V_1) = (640 \text{ ppm})(5 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{(640 \cancel{\text{ppm}})(5 \text{ ml})}{(1{,}000 \cancel{\text{ppm}})}$$

$$V_1 = 3.20 \text{ ml}$$

ดังนั้น

การเจือจางสารละลายสารสกัดหัวแก่นตะวัน ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ให้มีความเข้มข้น 640 พีพีเอ็ม จะต้องปิเปตสารละลายมา 3.20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

5. การคำนวณค่า %Inhibition

จากสูตร

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

เมื่อ

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

A^{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH radical

ตัวอย่างการคำนวณ

การคำนวณ %Inhibition ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม จากค่าการดูดกลืนแสง

เมื่อ $A^{control} = 1.6563$

$A^{sample} = 1.1828$

จากสูตร

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

$$= \frac{(1.6563 - 1.1828)}{1.6563} \times 100$$

$$= 28.5888 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

ดังนั้น

%Inhibition ของสารละลายวิตามินซี ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม เท่ากับ 28.5888 เปอร์เซ็นต์

6. การคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากสูตร

$$S.D. = \sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{N-1}}$$

เมื่อ

S.D. คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดข้อมูล

N คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

Σ คือ ผลรวม

X คือ ข้อมูล

ตัวอย่างการคำนวณ

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของมาตรฐานวิตามินซี

เมื่อ $\bar{X}$ = 27.5560

X = 27.2042, 27.8125, 27.6515

N = 3

$$= \sqrt{\frac{(27.2042-27.5560)^2+(27.8125-27.5560)^2+(27.6515-27.5560)^2}{3-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{(0.3518)^2+(-0.2564)^2+(-0.0954)^2}{2}}$$

= 0.3152

ดังนั้น

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี เท่ากับ 0.3152

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาค่า IC_{50}, TEAC และปริมาณฟีนอลิกรวม

1. การคำนวณหาค่า IC_{50} (50% of inhibitory concentration)

1.1 การคำนวณของมาตรฐานวิตามินซี

จากสมการ $Y = 1.9506x + 18.044$

แทน $Y = 50$ ในสมการ

$50 = 1.9560x + 18.044$

$$X = \frac{(50-18.044)}{1.9506}$$

จะได้ค่า $IC_{50} = 16.38$ ppm

1.2 การคำนวณของมาตรฐานบีเอชเอ

จากสมการ $Y = 2.0246x + 32.03$

แทน $Y = 50$ ในสมการ

$50 = 2.0246x + 32.03$

$$X = \frac{(50-32.03)}{2.0246}$$

จะได้ค่า $IC_{50} = 8.88$ppm

1.3 การคำนวณของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

จากสมการ $Y = 0.259x + 31.948$

แทน $Y = 50$ ในสมการ

$50 = 0.259x + 31.948$

$$X = \frac{(50-31.948)}{0.259}$$

จะได้ค่า $IC_{50} = 69.6988$ ppm

2. การคำนวณหา TEAC

2.1 การคำนวณของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

ขั้นตอนที่ 1 คำนวณหาค่า %Inhibition

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6834

A^{sample} = 0.3323

$$\%Inhibition = \frac{(0.6834-0.3323)}{0.6834} \times 100$$

= 51.3755 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6863

A^{sample} = 0.3376

$$\%Inhibition = \frac{(0.6863-0.3376)}{0.6863} \times 100$$

= 50.8087 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6895

A^{sample} = 0.3316

$$\%Inhibition = \frac{(0.6895-0.3316)}{0.6895} \times 100$$

= 51.9023 เปอร์เซ็นต์

หา %Inhibition เฉลี่ย

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(51.3755+50.8087+51.9023)}{3}$$

$$= \quad 51.3622 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

ดังนั้น

ค่า %Inhibition เฉลี่ย เท่ากับ 51.3622 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณหาน้ำหนักสารสกัด (มิลลิลิตร) จากปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.3000 มิลลิลิตร ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิล–อะซิเตท ความเข้มข้น 80 พีพีเอ็ม

แสดงว่า

เอทานอล 1000 มิลลิลิตร มีสารสกัดหัวแก่นตะวัน 80 มิลลิกรัม

ถ้า เอทานอล 0.3000 มิลลิกรัม จะมีสารสกัดหัวแก่นตะวัน เท่ากับ

$$= \frac{(0.3000 \text{ ~~ml~~})(80 \text{ mg})}{1{,}000 \text{ ~~ml~~}}$$

$$= \quad 0.024 \text{ mg}$$

ดังนั้น

ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.3000 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 0.024 มิลลิกรัม

ขั้นตอนที่ 3 คำนวณหาค่า %Inhibition ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิกรัม ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

จาก ขั้นตอนที่ 1 %Inhibition เท่ากับ 51.3622 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 สารสกัดเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 0.024 มิลลิกรัม

แสดงว่า

สารสกัดเอทิลอะซิเตท 0.024 มิลลิกรัม มี %Inhibition 51.3622

ถ้า สารสกัดเอทิลอะซิเตท 1 มิลลิกรัม จะมี %Inhibition เท่ากับ

$$= \frac{(1\ \text{mg})(51.3622\ \%)}{0.024\ \text{mg}}$$

$$= 2{,}140.0917\ \%$$

ดังนั้น

ค่า %Inhibition ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิกรัมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 2,140.0917 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 4 คำนวณหาค่า TEAC

จากกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

$$Y = 1.6939x + 14.844$$

จากนั้น

นำค่า %Inhibition ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิกรัมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท แทนในค่า Y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า X ซึ่งเป็นค่า TEAC ในหน่วย ppm

จากสมการ $Y = 1.6939x + 14.844$

แทน $Y = 2,140.0917$ ในสมการ

$$2,140.0917 = 1.6939x + 14.844$$

$$X = \frac{(2,140.0917 - 14.844)}{1.7147}$$

$$= 1,254.6477 \text{ ppm}$$

จากนั้น

นำค่า 1,254.6477 พีพีเอ็ม เปลี่ยนเป็นหน่วย มิลลิโมลลาร์

เมื่อ มวลโมเลกุลโทลอกซ์ = 250.29 กรัม/โมล

ขั้นตอนที่ 1 เปลี่ยนหน่วย พีพีเอ็ม หรือมิลลิกรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย กรัม/ลิตร

$$\frac{1,254.6477 \text{ mg/L}}{1,000} = 1.2546 \text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 2 เปลี่ยนหน่วย กรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย โมล

$$\frac{1.2546 \text{ g/L}}{250.29 \text{ g/mol}} = 5.0128 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

หรือ 5.0128×10^{-3} M

ขั้นตอนที่ 3 เปลี่ยนหน่วย โมล ให้เป็น มิลลิโมลาร์

$(5.0128 \times 10^{-3} \text{ M})(1000) = 5.0128 \text{ mM}$

ดังนั้น

ค่า TEAC ของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 5.0128 มิลลิโมลาร์

2.2 การคำนวณของวิตามินซี

ขั้นตอนที่ 1 คำนวณหาค่า %Inhibition

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6834

A^{sample} = 0.0033

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(0.6834-0.0033)}{0.6834} \times 100$$

= 99.5220 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6863

A^{sample} = 0.0038

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(0.6863-0.0038)}{0.6863} \times 100$$

= 99.4512 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6895

A^{sample} = 0.0041

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(0.6895-0.0041)}{0.6895} \times 100$$

= 99.4005 เปอร์เซ็นต์

หา %Inhibition เฉลี่ย

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(99.5220+99.4512+99.4005)}{3}$$

$$= 99.4579 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

ดังนั้น

ค่า %Inhibition เฉลี่ย เท่ากับ 99.4579 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณหาน้ำหนักวิตามินซี (มิลลิกรัม) จากปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.3000 มิลลิลิตร ของวิตามินซี ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

แสดงว่า

เอทานอล 1000 มิลลิลิตร มีวิตามินซี 100 มิลลิกรัม

ถ้า เอทานอล 0.3000 มิลลิกรัม จะมีวิตามินซี เท่ากับ

$$= \frac{(0.3000 \text{ ~~ml~~})(100 \text{ mg})}{1{,}000 \text{ ~~ml~~}}$$

$$= 0.0300 \text{ mg}$$

ดังนั้น

ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.3000 มิลลิลิตร จะมีวิตามินซีเท่ากับ 0.0300 มิลลิกรัม

ขั้นตอนที่ 3 คำนวณหาค่า %Inhibition ต่อน้ำหนัก 1 มิลลิกรัม ของวิตามินซี

จาก ขั้นตอนที่ 1 %Inhibition เท่ากับ 99.4579 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 วิตามินซี เท่ากับ 0.0300 มิลลิกรัม

แสดงว่า

วิตามินซี 0.0300 มิลลิกรัม มี %Inhibition 99.4579

ถ้า วิตามินซี 1 มิลลิกรัม จะมี %Inhibition เท่ากับ

$$= \frac{(1\ \cancel{mg})(99.4579\ \%)}{0.0300\ \cancel{mg}}$$

$$= 3{,}315.263\ \%$$

ดังนั้น

ค่า %Inhibition ต่อน้ำหนัก 1 มิลลิกรัมของวิตามินซี เท่ากับ 3,315.263 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 4 คำนวณหาค่า TEAC

จากกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

$$Y = 1.6939x + 14.844$$

จากนั้น

นำค่า %Inhibition ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิกรัมของวิตามินซี แทนในค่า Y ในสมการ เพื่อคำนวณหาค่า X ซึ่งเป็นค่า TEAC ในหน่วย ppm

จากสมการ $Y = 1.6939x + 14.844$

แทน $Y = 3{,}315.263$ ในสมการ

$$3{,}315.263 = 1.6939x + 14.844$$

$$x = \frac{(3{,}315.263 - 14.844)}{1.6939}$$

$$= 1{,}948.25 \text{ ppm}$$

จากนั้น

นำค่า 1,948.25 พีพีเอ็ม เปลี่ยนเป็นหน่วย มิลลิโมลลาร์

เมื่อ

มวลโมเลกุลโทลอกซ์ = 250.29 กรัม/โมล

ขั้นตอนที่ 1 เปลี่ยนหน่วย พีพีเอ็ม หรือมิลลิกรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย กรัม/ลิตร

$$\frac{1{,}948.25 \text{ mg/L}}{1{,}000} = 1.9483 \text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 2 เปลี่ยนหน่วย กรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย โมล

$$\frac{1.9483 \text{ g/L}}{250.29 \text{ g/mol}} = 7.7842 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

หรือ 7.7842×10^{-3} M

ขั้นตอนที่ 3 เปลี่ยนหน่วย โมล ให้เป็น มิลลิโมลาร์

$$(7.7842 \times 10^{-3} \text{ M})(1{,}000) = 7.7842 \text{ mM}$$

ดังนั้น

ค่า TEAC วิตามินซี เท่ากับ 7.7842 มิลลิโมลาร์

2.3 การคำนวณของบีเอชเอ

ขั้นตอนที่ 1 คำนวณหาค่า %Inhibition

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6834

A^{sample} = 0.0036

$$\%Inhibition = \frac{(0.6834-0.0036)}{0.6834} \times 100$$

= 99.4805 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6863

A^{sample} = 0.0035

$$\%Inhibition = \frac{(0.6863-0.0035)}{0.6863} \times 100$$

= 99.4924 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3

เมื่อ $A^{control}$ = 0.6895

A^{sample} = 0.0034

$$\%Inhibition = \frac{(0.6863-0.0035)}{0.6863} \times 100$$

= 99.5141 เปอร์เซ็นต์

หา %Inhibition เฉลี่ย

$$\%Inhibition = \frac{(99.4805+99.4924+99.5141)}{3}$$

= 99.4957 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น

ค่า %Inhibition เฉลี่ย เท่ากับ 99.4957 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณหาน้ำหนักบีเอชเอ (มิลลิกรัม) จากปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.3000 มิลลิลิตร ของบีเอชเอ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

แสดงว่า

เอทานอล 1000 มิลลิลิตร มีบีเอชเอ 100 มิลลิกรัม

ถ้า เอทานอล 0.3000 มิลลิกรัม จะมีบีเอชเอ เท่ากับ

$$= \frac{(0.0300\ \cancel{\text{ml}})(100\ \text{mg})}{1{,}000\ \cancel{\text{ml}}}$$

$$= 0.0300\ \text{mg}$$

ดังนั้น

ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.300 มิลลิลิตร จะมีบีเอชเอ เท่ากับ 0.0300 มิลลิกรัม

ขั้นตอนที่ 3 คำนวณหาค่า %Inhibition ต่อน้ำหนัก 1 มิลลิกรัม ของบีเอชเอ

จาก ขั้นตอนที่ 1 %Inhibition เท่ากับ 99.4957 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 บีเอชเอ เท่ากับ 0.0300 มิลลิกรัม

แสดงว่า

บีเอชเอ 0.0300 มิลลิกรัม มี %Inhibition 99.4957

ถ้า บีเอชเอ 1 มิลลิกรัม จะมี %Inhibition เท่ากับ 0.0300 มิลลิกรัม

$$= \frac{(1\ \cancel{\text{mg}})(99.4957\ \%)}{0.0300\ \cancel{\text{mg}}}$$

$$= 3{,}316.53\%$$

ดังนั้น

ค่า %Inhibition ต่อน้ำหนัก 1 มิลลิกรัมของบีเอชเอ เท่ากับ 3,316.53 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 4 คำนวณหาค่า TEAC

จากกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

$$Y = 1.6939x + 14.844$$

จากนั้น

นำค่า %Inhibition ต่อน้ำหนัก 1 มิลลิกรัมของบีเอชเอ แทนในค่า Y ในสมการ เพื่อ คำนวณหาค่า X ซึ่งเป็นค่า TEAC ในหน่วย ppm

จากสมการ $Y = 1.6939x + 14.844$

แทน $Y = 3,316.53$ ในสมการ

$$3,316.53 = 1.6939x + 14.844$$

$$x = \frac{(3,316.53 - 14.844)}{1.6939}$$

$$= 1,948.85 \text{ ppm}$$

จากนั้น

นำค่า 1,948.85 พีพีเอ็ม เปลี่ยนเป็นหน่วย มิลลิโมลลาร์

เมื่อ

มวลโมเลกุลโทลอกซ์ = 250.29 กรัม/โมล

ขั้นตอนที่ 1 เปลี่ยนหน่วย พีพีเอ็ม หรือมิลลิกรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย กรัม/ลิตร

$$\frac{1,948.85 \text{ mg/L}}{1,000} = 1.9489 \text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 2 เปลี่ยนหน่วย กรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย โมล

$$\frac{1.9489 \text{ mg/L}}{1,000} = 7.7866 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

หรือ 7.7866×10^{-3} M

ขั้นตอนที่ 3 เปลี่ยนหน่วย โมล ให้เป็น มิลลิโมลาร์

$(7.7866 \times 10^{-3}\ M)(1{,}000) \quad = \quad 7.7866\ mM$

ดังนั้น

ค่า TEAC บีเอชเอ เท่ากับ 7.7866 มิลลิโมลาร์

3. การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม

3.1 การคำนวณของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

ตาราง ค1 จากขั้นตอนการทดลองหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท

ขั้นตอนการทดลอง การหาปริมาณฟีนอลิกรวม	ปริมาตร
1. น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน	1 กิโลกรัม
2. น้ำหนักสารสกัดหัวแก่นตะวัน	6.2 กรัม
3. น้ำหนักสารสกัดที่ใช้ทดสอบ	0.0008 กรัม
4. ปริมาตรในขวดปรับปริมาตร	10 มิลลิลิตร
5. ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ	0.2000 มิลลิลิตร
6. ค่าการดูดกลืนแสง	0.1723

(ให้คิดคำนวณย้อนกลับจากวิธีทำสุดท้ายไปหาวิธีทำแรก)

ตัวอย่างการคำนวณ

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม จะได้สมการเส้นตรง

$$Y = 0.0103x + 0.0633$$

จากนั้น

นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท แทนค่าใน Y ในสมการเพื่อคำนวณหา X ซึ่งปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย ppm

จากสมการ $Y = 0.0103x + 0.0633$

แทน $Y = 0.1723$

$$0.1723 = 0.0103x + 0.0633$$

$$x = \frac{(0.1723-0.0633)}{0.0103}$$

$$= 10.5825 \text{ ppm}$$

นำค่า 10.5825 พีพีเอ็ม เทียบเป็นหน่วย มิลลิกรัม

แสดงว่า

เมทานอล 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลิกรวม 10.5825 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 0.2000 มิลลิลิตร จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(0.2000 \text{ ml})(10.5825 \text{ mg})}{1{,}000 \text{ ml}}$$

$$= 0.0021 \text{ mg}$$

ดังนั้น

เมทานอล 0.2000 มิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.0021 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 10 มิลลิลิตร จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(10\text{ml})(0.0021 \text{ mg})}{0.2000 \text{ ml}}$$

$$= \frac{(0.1058 \text{ mg})}{1{,}000}$$

$$= 0.0001 \text{ g}$$

แสดงว่า

น้ำหนักสารสกัดที่ใช้ทดสอบ 0.0008 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.0001 กรัม

ถ้า น้ำหนักสารสกัดทั้งหมด 6.2 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(6.2 \text{ g})(0.0001 \text{ g})}{0.0008 \text{ g}}$$

$$= 0.8201 \text{ g}$$

แสดงว่า

น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน 1,000 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.8201 กรัม

ถ้า น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน 1 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(1\ g)(0.8201\ g)}{1{,}000\ g}$$

$$= (0.8201\ g)\ (1{,}000)$$

$$= 0.8201\ mg$$

ดังนั้น

สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ต่อ น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน 1 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.8201 mg GAE/gdw

4. การคำนวณหาปริมาณของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทิลอะซีเตท

ตาราง ค2 แสดงขั้นตอนการทดลองหาปริมาณของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท

สารสกัดหัวแก่นตะวัน	ปริมาตร
1. น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน	1 กิโลกรัม
2. น้ำหนักสารสกัดหัวแก่นตะวัน	6.2 กรัม
3. น้ำหนักสารสกัดที่ใช้ทดสอบ	0.0008 กรัม
4. ปริมาตรในขวดปรับปริมาตร	10 มิลลิตร
5. ปริมาตรสารละลายที่นำมาทดสอบ	0.2000 มิลลิลิตร
6. ค่าการดูดกลืนแสง	1.5508

ตัวอย่างการคำนวณ

จากกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม จะได้สมการเส้นตรง

$$y = 0.0049x + 0.0757$$

จากนั้น

นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท แทนค่าใน y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต ในหน่วย ppm

จากสมการ $y = 0.0049x + 0.0757$

$y = 1.5508$ ในสมการ

$1.5508 = 0.0049x + 0.0757$

$$x = \frac{(1.5508 - 0.0757)}{0.0049}$$

$= 301.0408$ mg/L

คำนวณเทียบกับ เฟอร์รัสซัลเฟต

แสดงว่า

ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 80 mg/L ในขวดปรับปริมาตร 10 ml

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.20 ml

สารละลาย 1,000 ml จะมีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต เท่ากับ 301.0408 mg

ถ้า สารละลายตัวอย่าง 0.20 ml มีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต เท่ากับ

$$= \frac{(301.0408 \text{ mg})(0.20 \cancel{\text{ml}})}{1{,}000 \cancel{\text{ml}}}$$

$$= 0.0602 \text{ mg}$$

จากสารละลายที่ปิเปต 0.20 ml มีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต เท่ากับ 0.0602 mg

ถ้าสารละลายตัวอย่าง 10 ml จะมีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต เท่ากับ

$$= \frac{(10 \cancel{\text{ml}})(0.0602 \text{ mg})}{0.20 \cancel{\text{ml}}}$$

$$= 3.0104 \text{ mg}$$

คิดปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต ต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ

ชั่งสารตัวอย่าง 0.0008 กรัม มีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต 3.0104 มิลลิกรัม

ถ้า น้ำหนักสารสกัดทั้งหมด 6.2000 กรัม จะมีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต เท่ากับ

$$= \frac{(3.0104 \text{ mg})(6.2000 \cancel{\text{g}})}{0.0008 \cancel{\text{g}}}$$

$$= 2{,}333.066 \text{ mg}$$

แสดงว่า

น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน 1,000 กรัม มีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต 2,333.066 มิลลิกรัม

ถ้า น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน 1 กรัม จะมีปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต เท่ากับ

$$= \frac{(1 \cancel{\text{g}})(2{,}333.066 \text{ mg})}{1{,}000 \cancel{\text{g}}}$$

$$= 2.3331 \text{ mg}$$

ดังนั้น

สารสกัดหัวแก่นตะวันที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ต่อ น้ำหนักแห้งหัวแก่นตะวัน 1 กรัม จะมีค่า FRAP values เท่ากับ 2.3331 มิลลิกรัม

ประวัติผู้ศึกษาวิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวชุติมา มัชฌเวทย์

วันเดือนปีเกิด 22 พฤศจิกายน 2539

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2554 ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนศรียานุสรณ์ ตำบลวัดใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี

พ.ศ. 2557 ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนศรียานุสรณ์ ตำบลวัดใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี

ที่อยู่ปัจจุบัน 39/10 หมู่ 6 ตำบลทับไทร อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี รหัสไปรษณีย์ 22140

เบอร์ติดต่อ 061-3736842

อีเมล์ chutima_mew1996@hotmail.com

ประวัติผู้ศึกษาวิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวนิโลบล ทีสุ่ม

วันเดือนปีเกิด 1 มีนาคม 2540

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2554 ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนเทศบาลบ้านปากทาง ตำบลปากทาง อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร

พ.ศ. 2557 ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนเทศบาลบ้านปากทาง ตำบลปากทาง อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร

ที่อยู่ปัจจุบัน 72/1 หมู่ 5 ตำบลไผ่ขวาง อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร รหัสไปรษณีย์ 66000

เบอร์ติดต่อ 083-6240494

อีเมล์ NuFarSkyKy6829@gmail.com