ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เสริมพงศ์ เดชสูงเนิน

GRAD VRU

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา
บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี
พ.ศ. 2558

EFFICIENCY AND CHEMICAL COMPOSITION OF A CRUDE EXTRACT OF *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. LEAVES AS AN ANTIOXIDANT

SOEMPHONG DEJSUNGNOEN

GRAD VRU

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN SCIENCE EDUCATION
GRADUATE SCHOOL
VALAYA ALONGKORN RAJABHAT UNIVERSITY
UNDER THE ROYAL PATRONAGE PATHUM THANI
2015

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮ่วนจ็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ชื่อนักศึกษา	เสริมพงศ์ เดชสูงเนิน
รหัสประจำตัว	53G54670103
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตรศึกษา

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศมล ผาสุข)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัณณ์รภัส ถกลภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.เปรมจิตร บุญสาย)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัณณ์รภัส ถกลภักดี)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพดี เส้นขาว)

..... กรรมการและเลขานุการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศมล ผาสุข)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิ
(อาจารย์ ดร.วรางคณา จิตตชุ่ม)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร์ธนิกษ์ ศิริโวหาร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 19 เดือน กันยายน พ.ศ. 2558

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ชื่อนักศึกษา	เสริมพงศ์ เดชสูงเนิน
รหัสประจำตัว	53G54670103
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตรศึกษา
ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศมล ผาสุข
กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัณณ์รภัส ถกลภักดี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) วิเคราะห์ปริมาณและชนิดกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในใบฮว่านง็อก 2) แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 3) ศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้ 4) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด 5) ถ่ายทอดความรู้จากผลการวิจัยโดยพัฒนาเป็นบทปฏิบัติการรายวิชา “เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์” ให้กับนักศึกษา งานวิจัยนี้ทำการสกัดสารจากใบฮว่านง็อกโดยวิธีการแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดหยาบได้แก่ ฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรสโกปี วิเคราะห์สเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ แอลคาลอยด์ และฟลาโวนอยด์ ด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง และทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้ด้วยวิธี ดีพีพีเอช และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแบบวิเคราะห์มวลโมเลกุล นำความรู้จากผลการวิจัยทั้งหมดที่ได้ไปถ่ายทอดความรู้โดยพัฒนาบทปฏิบัติการรายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์ให้กับนักศึกษา และหาคุณภาพของบทปฏิบัติการโดยหาค่าดัชนีความสอดคล้องก่อนนำบทปฏิบัติการไปใช้ในการเรียนการสอน

ผลการวิจัยพบว่า

1. สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกประกอบด้วยฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1.80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แทนนินทั้งหมดเท่ากับ 1.85 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 40.52 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง พบว่า ใบฮว่านง็อกมีสารกลุ่มสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แต่ไม่พบสารกลุ่มแอลคาลอยด์

2. เมื่อทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิคคอลัมน์-โครมาโทกราฟีพบว่าแยกสารสกัดออกได้เป็นทั้งหมด 7 กลุ่ม ประกอบด้วย 169 ส่วนย่อย ซึ่งได้จากการรวมสารที่มีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากันกันด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

3. สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.031 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารที่แยกได้ทั้ง 7 กลุ่ม มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.329, 0.254, 1.597, 0.177, 0.061, 0.059 และ 0.095 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานบีเอชที และบีเอชเอ ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.063 และ 0.062 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มที่ 6 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มที่ 6 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด พบสารบิส (2-เอทิลเฮกซิล) พาทาเลทเป็นองค์ประกอบสำคัญ

5. การพัฒนาบทปฏิบัติการรายวิชา “เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์” พบว่า บทปฏิบัติการที่ 1, 2 และ 3 มีค่าดัชนีความสอดคล้องเท่ากับ 0.96, 1 และ 0.96 ตามลำดับ

GRAD VRU

Thesis Title	Efficiency and Chemical Composition of a Crude Extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. Leaves as an Antioxidant
Student	Soemphong Dejsungnoen
Student ID	53G54670103
Degree	Master of Science
Field of Study	Science Education
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr.Sasamol Phasuk
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Dr.Pannraphat Takolpuckdee

ABSTRACT

This study aimed to 1) analyze and identify the chemical composition of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. (*P. palatiferum*) leaves, 2) isolate the chemical compounds in a crude extract of *P. palatiferum* leaves, 3) study the efficiency of *P. palatiferum* leave crude extracts as an antioxidant and their chemical compounds, 4) analyze the chemical compounds of the group with the highest antioxidant activity and 5) transfer the research knowledge by developping a laboratory manual entitled “Natural Product Chemistry for science teachers” for science students. In this work, the *P. palatiferum* leave crude extracts were obtained using a maceration technique. All chemical compounds in the *P. palatiferum* leave crude extracts, such as phenolic, tannin, and flavonoids, were analyzed using UV-Visible spectroscopy. Steroid-terpenes, alkaloids and flavonoids were identified using the thin layer chromatography fingerprint technique and the chemical compounds were isolated using column chromatography. The antioxidant efficiency of the *P. palatiferum* leave crude extracts and its chemical compounds were tested using DPPH radical scavenging assay. The highest antioxidant activity compound was analyzed using gas chromatography with mass spectrometer (GC-MS). Finally, in order to transfer the research knowledge, a laboratory manual entitled “Natural Product Chemistry for science teachers” was prepared. The quality of the laboratory manual was determined by the findings of the Index of Congruence prior to giving it to teachers.

The results were as follows:

1. The *P. palatiferum* leave crude extracts showed a total phenolic contents of 1.80 mg/mL, a total tannin contents of 1.85 mg/mL and a total flavonoid contents of 40.52 mg/mL. The results of the thin layer chromatography showed that the

significant chemical compounds were steroid-terpenes and flavonoids while alkaloids were not observed.

2. The *P. palatiferum* leave crude extracts were separated by use of column chromatography into 7 groups, with 169 fractions. All of the collected fractions were obtained from the same rate of flow via thin layer chromatography.

3. The *P. palatiferum* leave crude extracts showed high level of antioxidant activity with EC_{50} at 0.031 mg/mL and their 7 chemical compound groups showed high levels of antioxidant activity with EC_{50} at 0.329, 0.254, 1.597, 0.177, 0.061, 0.059 and 0.095 mg/mL, respectively. By comparison to BHT and BHA, the results showed that the values of EC_{50} were 0.063 and 0.062 mg/mL, respectively. The 6^{th} group was had the highest antioxidant activity.

4. Bis (2-ethylhexyl) phthalate was found in the results of the GC-MS from the 6^{th} group.

5. The laboratory manual entitled “Natural Product Chemistry for science teachers” was prepared and determined the quality with the Index of Congruence results of the first, second and third lessons were 0.96, 1, and 0.96, respectively.

GRAD VRU

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จด้วย ความกรุณาจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศมล ผาสุข ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัณณ์รภัส ถกลภักดี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้สละเวลาให้คำปรึกษาแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.เปรมจิตร บุญสาย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพดี เส้นขาว และอาจารย์ ดร.วรางคณา จิตตชุ่ม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่า รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงษ์ แสง-ชูโต จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รองศาสตราจารย์ ดร.วิลาศ พุ่มพิมล จากมหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ เพ็งพัด จากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือที่ใช้ในบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ และให้ความช่วยเหลือในการใช้ห้องปฏิบัติการ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์ที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญุตาบูชาแด่บิดา มารดา ครู อาจารย์ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

เสริมพงศ์ เดชสูงเนิน

GRAD VRU

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ความรู้เกี่ยวกับพืชสมุนไพรฮว่านง็อก 4
2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร 5
2.3 เทคนิคการวิเคราะห์และแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพร. 7
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ 9
2.5 การสอนเชิงปฏิบัติการ 13
2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 25
3.1 การสำรวจข้อมูลพื้นฐาน 26
3.2 การวางแผนการทดลอง 26
3.3 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ 26
3.4 ถ่ายทอดความรู้จากผลการวิจัยโดยการพัฒนาบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์.... 33
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 36
4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี ในใบฮว่านง็อก 36
4.2 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 39
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก และสารที่แยกได้ 40
4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก ที่สุด 47

GRAD VRU

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลการพัฒนาบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์รายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สำหรับครูวิทยาศาสตร์ 47

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 51

5.1 สรุปผลการวิจัย 51

5.2 อภิปรายผลการวิจัย 51

5.3 ข้อเสนอแนะ 52

บรรณานุกรม 53

ภาคผนวก 58

ภาคผนวก ก ผลการทดสอบสารด้วยเทคนิค GC-MS 59

ภาคผนวก ข หนังสือเชิญผู้ทรงคุณวุฒิ 61

ภาคผนวก ค เอกสารประกอบบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ 65

ภาคผนวก ง ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ของบทปฏิบัติการ 108

ประวัติผู้วิจัย 112

GRAD VRU

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay.....	32
4.1	ผลการรวมส่วนย่อยที่ได้จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อก.....	39
4.2	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อกและสารที่แยกได้เทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA	45
4.3	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด...	47
4.4	สรุปค่าดัชนีความสอดคล้องของบทปฏิบัติการ เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง.....	48
4.5	สรุปค่าดัชนีความสอดคล้องของบทปฏิบัติการ เรื่องการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮ่วนง็อกด้วยอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์.....	49
4.6	สรุปค่าดัชนีความสอดคล้องของบทปฏิบัติการ เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮ่วนง็อกด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay.....	50

GRAD VRU

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ต้นฮว่านง็อก	4
2.2	The Concentration-effect Curve. เมื่อทำการสร้างกราฟบน Linear Scale (ซ้าย) และเมื่อทำการสร้างกราฟบน Semi-log Scale (ขวา)	12
3.1	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	25
4.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก	36
4.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก	37
4.3	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานรูทิน	37
4.4	TLC Fingerprints ของกลุ่มสารสำคัญในใบฮว่านง็อก: PP (1), PP (2) และ PP (3) คือสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก Std. (1) คือสารกลุ่มเสตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ Std. (2) คือสารกลุ่มแอลคาลอยด์ และ Std. (3) คือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์	38
4.5	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก	40
4.6	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 1	40
4.7	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 2	41
4.8	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 3	41
4.9	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 4	42
4.10	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 5	42
4.11	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 6	43
4.12	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 7	43
4.13	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน BHT	44
4.14	กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน BHA	44
4.15	สูตรโครงสร้างสาร Bis (2-ethylhexyl) Phthalate	47

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารอนุมูลอิสระ (Free Radical) หมายถึง สารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอมหรือโมเลกุล เช่น Hydroxyl Radical, Superoxide, Peroxyl, Alkoxyl และ Oxides ของ Nitrogen โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะเวลามีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิล อยู่เป็นจำนวนน้อย ๆ มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และร่างกายก็จะมีระบบของสารต้านอนุมูลอิสระขจัดออกไป แต่ถ้าร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป หรือได้รับอาหารบางชนิดจากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูง ๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตร้าไวโอเลต การแผ่รังสีเอกซ์ หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายจะขจัดหมด หรือในภาวะที่จำนวนของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง เช่น ผู้สูงอายุ ก็จะทำให้มีสารอนุมูล-อิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเพอออกไซด์ ซึ่งมีออกซิเจนเป็นศูนย์กลางเช่นกัน โดยรวมเรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) มากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายได้ สารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะ Low Density Lipoprotein) โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญ และมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ หรือ โรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่ เป็นต้น เราจึงควรหลีกเลี่ยงการที่จะรับสารอนุมูล-อิสระเข้าไปในร่างกาย เช่น มลพิษในสิ่งแวดล้อม ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ควันบุหรี่ เป็นต้น

ในปัจจุบันคนไทยเริ่มให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรมากขึ้นทั้งที่ใช้เป็นยาบำรุงสุขภาพ และเป็นยารักษาโรค ซึ่งเราถือว่าการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์นั้น นับเป็น “ภูมิปัญญาชาวบ้าน” ที่สมควรแก่การอนุรักษ์ อีกทั้งในปัจจุบันวิทยาศาสตร์การแพทย์สมัยใหม่ก็หันมาให้ความสนใจกับพืชสมุนไพร ข้อดีประการหนึ่งของการนำพืชสมุนไพรมาใช้คือ ทำให้เราตระหนักถึงความสำคัญของพืชสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศ หลายหน่วยงานเริ่มทำการวิจัย และรวบรวมข้อมูลของสมุนไพรไทยตั้งแต่ลักษณะทางกายภาพของพืชสมุนไพร และสรรพคุณทางยา ซึ่งมีการรวบรวมและตีพิมพ์เป็นหนังสือเกี่ยวกับพืชสมุนไพรไทยไว้มากมาย

ฮว่านง็อก หรือ *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. เป็นพืชสมุนไพรจำพวกไม้พุ่ม ใบสีเขียวเรียวแหลมเรียงตรงข้าม ลำต้นเป็นสี่เหลี่ยม เปลือกต้นผิวเรียบมันสีเขียว ดอกเป็นช่อสีชมพูแกมน้ำเงิน สูงเต็มที่ได้ 1-3 เมตร สามารถขึ้นได้ดีทั้งในที่ร่มและที่แจ้ง ชอบแสงรำไร มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศเวียดนาม ชาวเวียดนามได้นำฮว่านง็อกมาทำเป็นชาสำหรับชงดื่มควบคู่กับการรับประทานแบบใบสด ๆ และกำลังเป็นที่นิยมอย่างมากในหมู่คนไทย ซึ่งมีกล่าวอ้างถึง

สรรพคุณในหลาย ๆ ด้าน เช่น รักษาอาการปวดเมื่อยร่างกาย รักษาอาการอ่อนเพลีย รักษาไข้หวัด รักษาความดันโลหิตสูง รักษาบาดแผล รักษาโรคระบบทางเดินอาหาร รักษากระเพาะปัสสาวะอักเสบ เป็นต้น นอกจากนี้ จากการศึกษาวิจัย ยังพบว่าสารสกัดใบฮ่วนง็อกเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (ศศมล ผาสุข และประเสริฐ มีรัตน์, 2557) และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปัจจัยเสี่ยง (Risk Factor) สำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง คือ การได้รับสารอนุมูลอิสระเข้าไปในร่างกายปริมาณมากเกินไป

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเป็นพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป โดยวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกลุ่มสารสำคัญจากนั้นแยกองค์ประกอบทางเคมี ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารที่แยกได้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และนำผลการวิจัยที่ได้ไปพัฒนาบทปฏิบัติการรายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 วิเคราะห์ปริมาณและชนิดกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในใบฮ่วนง็อก

1.2.2 แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อก

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อกและสารที่แยกได้

1.2.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

1.2.5 ถ่ายทอดความรู้จากผลการวิจัยโดยพัฒนาบทปฏิบัติการรายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์ให้กับนักศึกษา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 พืชที่ใช้ในการวิจัยคือ ฮ่วนง็อก หรือ *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. วงศ์ Acanthaceae จากจังหวัดสิงห์บุรี โดยส่วนที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้คือ ใบฮ่วนง็อกนำมาทำให้แห้งบดละเอียด

1.3.2 ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้คือ เอทานอล นำมาสกัดโดยวิธีแช่ยุ่ย (Maceration)

1.3.3 วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อก 3 กลุ่ม ได้แก่ ฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

1.3.4 วิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของใบฮ่วนง็อกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบางเคลือบผิว (TLC fingerprints) ได้แก่ สารสเตอร์รอยด์-เทอร์ปีน แอลคอลอยด์ และฟลาโวนอยด์

1.3.5 แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

1.3.6 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อกและสารที่แยกได้ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

1.3.7 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มากที่สุดด้วยเทคนิค Gas Chromatography/ Mass Spectrometer (GC-MS)

1.3.8 พัฒนาบทปฏิบัติการรายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์ให้กับนักศึกษาจำนวน 3 บทปฏิบัติการ

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.4.1 สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก หมายถึง สารที่สกัดได้จากใบฮว่านง็อกแห้งบดละเอียดนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลแล้วระเหยตัวทำละลายออก ได้เป็นสารสกัดหยาบ

1.4.2 องค์ประกอบทางเคมี หมายถึง สารอินทรีย์ที่มีอยู่และแยกได้จากสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

1.4.3 ประสิทธิภาพของสารสกัด หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอนุมูลอิสระ DPPH โดยพิจารณาจากค่า EC_{50}

1.4.4 EC_{50} (50 % Effective Concentration) หมายถึง ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ DPPH เหลืออยู่ 50 % (Lo and Cheung, 2005) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับ % DPPH Scavenging โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism Version 6.01

1.4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก หมายถึง ฤทธิ์ของโมเลกุลของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอนุมูลอิสระ DPPH

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีของใบฮว่านง็อก

1.5.2 เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

1.5.3 ได้บทปฏิบัติการรายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์ ที่สามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนปฏิบัติการทดลองได้

เทบทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นพื้นฐานในการวิจัยดังนี้

2.1 ความรู้เกี่ยวกับพืชสมุนไพรฮว่านง็อก
2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร
2.3 เทคนิคการวิเคราะห์และแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพร
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ
2.5 การสอนเชิงปฏิบัติการ
2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้เกี่ยวกับพืชสมุนไพรฮว่านง็อก

ไม่ปรากฏผลงานวิจัยที่ยืนยัน สนับสนุน หรือการตรวจวิเคราะห์ทางด้านวิทยาศาสตร์ที่แสดงคุณสมบัติทางด้านเภสัชวิทยา พิษวิทยา หรือชีววิทยาของพืชสมุนไพรฮว่านง็อกเลย แต่มีข้อมูลจากเว็บไซต์ซึ่งแม้จะไม่รับรองความถูกต้องทางวิชาการ แต่ก็เป็นโจทย์วิจัยที่น่าค้นหาคำตอบ เช่น phoomtai.com, bookmuey.com, baansamunpri.com, hoanngoc-samunpai.com, และ thailandherb.wordpress.com เป็นต้น ตลอดจนข้อมูลสถาบันอาหารและยา กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยฯ กระทรวงสาธารณสุข และข้อมูลจากทีมสมุนไพรหนังสือพิมพ์คมชัดลึก และเดลินิวส์ ทำให้พอสรุปสาระเกี่ยวกับสมุนไพรฮว่านง็อก ได้ดังนี้

ภาพที่ 2.1 ต้นฮว่านง็อก
ที่มา: http://www.kasetporpeang.com

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pseuderamthemum palatiferum (Nees) Radlk*

ไฟลัม : Monocotyledon

วงศ์ : Acanthaceae

ชื่อสามัญอื่น ๆ : ฮว่านง็อก พญาวานร ว่านลิงฯ

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชจำพวกไม้พุ่ม มีถิ่นกำเนิดในป่าประเทศเวียดนามเหนือเป็นพืชใบสีเขียว เรียวแหลมเรียงตรงข้าม ลำต้นเป็นสี่เหลี่ยม เปลือกต้นผิวเรียบมันสีเขียวดอกเป็นช่อสีชมพูแกมน้ำเงิน สูงเต็มที่ ได้ 1-3 เมตร สามารถขึ้นได้ดีทั้งในที่ร่มและที่แจ้งชอบแสงรำไร

2.1.2 สรรพคุณ

เป็นพืชที่รู้จักกันดีว่าเป็นสมุนไพรที่รับประทานใบสด ๆ หรือต้มน้ำดื่ม สรรพคุณ อื่น ๆ ใช้แก้โรคท้องเสีย กระเพาะอาหารอักเสบ ลำไส้อักเสบ ไขข้ออักเสบ คออักเสบ ตกเลือด รักษาแผล ป้องกันโรคต่าง ๆ ฮว่านง็อกถูกนำเข้าประเทศไทยครั้งแรกหลังสงครามเวียดนาม โดยทหารไทยนำกลับมาเผยแพร่ ฮว่านง็อก มีชื่อเรียกในภาษาไทยว่า “พญาวานร” หรือ “ต้นลิงง้อ” ทั้งนี้มีความเชื่อคนพื้นบ้านว่า เมื่อลิงตัวเมียคลอดลูก ลิงตัวผู้จะเด็ดใบฮว่านง็อกมาให้ลิงตัวเมียกิน ช่วยให้คลอดลูกได้ง่ายขึ้น ฮว่านง็อกยังไม่มีรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างจริงจัง

2.1.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

มีการวิจัยกับสุกรโดยรักษาอาการท้องเสียในสุกรได้ ทดลองวิจัยเทียบกับยาปฏิชีวนะ เช่น ยาชนิดผสม คือ โคลิสติน (Colistin) ผสมกับ นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) และผสมกับเจนตาไมซิน (Gentamycin) และยาคลอไตรมาโซล (Clotrimazole) ได้ผลดีเท่ากัน มีผลต่อการเจริญเติบโตของลูกสุกร โดยมีน้ำหนักตัวดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้ โดยใช้ทดแทนการให้ยาปฏิชีวนะ

2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร ไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือใช้ตัวทำละลายใด ก็จะได้องค์ประกอบเป็นของผสม หรือสารสกัดหยาบ (Crude Extract) ซึ่งสมุนไพรนั้นมีองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically Active Constituents) ซึ่งมักเรียกว่า สารสำคัญ (Active Constituents) โดยชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะแปลเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้ และสภาวะที่ใช้ในการสกัด (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) วัตถุประสงค์ของการสกัดพืชสมุนไพร คือ

1) เพื่อสกัดแยกเอาสารสำคัญออกจากพืชสมุนไพร
2) เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูง
3) เพื่อลดขนาด (Dose) ของการใช้สมุนไพรลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

2.2.1 คุณสมบัติการเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารจากสมุนไพร

ตัวทำละลายนั้นต้องมีความสามารถในการละลายสารสำคัญได้มากที่สุด และไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่น ๆ ได้น้อย เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งอาจมีโครงสร้างซับซ้อนมากน้อยต่างกัน และมีอยู่ในพืชทั้งในสภาพอิสระ และการรวมตัวกับสารอื่น ๆ ในสภาพเกลือ หรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญ

ที่ต้องการสกัด นอกเหนือจากความมีขั้วของสารสำคัญดังกล่าว ในการเลือกน้ำยาสกัดมีกฎทั่วไป ว่าสิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (Like Dissolve Like)

2.2.1.1 เป็นตัวทำละลายที่มีความคงตัวดี หรือหาง่าย ราคาถูก

2.2.1.2 ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

2.2.1.3 สภาพของสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น เมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมัน ควรขจัดไขมันออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเธอร์ เป็นต้น

2.2.2 ตัวทำละลายในการสกัดสารจากสมุนไพร

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมสารสกัด ได้แก่ น้ำ แอลกอฮอล์ หรือสารละลายผสมของสารละลายทั้งสองชนิด

2.2.2.1 น้ำ (Water) จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย ราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียว เป็นตัวทำละลายมีข้อเสียหลายประการ คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่น น้ำตาล แป้ง ล้วนแต่เป็นอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการบูดเสีย และถ้าหากทำให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการละเหยน้ำออกไป ซึ่งอาจเกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้ ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้น้ำเดี่ยว ๆ เป็นน้ำยาสกัด

2.2.2.2 แอลกอฮอล์ (Alcohol) จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบ กับน้ำเนื่องจาก มีความจำเพาะในการละลายมากกว่าน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และหากต้องการทำให้สารสกัดเข้มข้นจะระเหยได้ง่าย แต่ราคาแอลกอฮอล์จะแพงกว่าน้ำ

2.2.2.3 น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (Hydroalcoholic Mixture) เป็นน้ำยาสกัดที่สามารถละลายสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แล้วราคาถูกกว่า อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำยาผสมช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่าง ๆ ในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้น้ำอย่างเดียวในการสกัด นอกเหนือจากน้ำยาสกัดต่าง ๆ ที่กล่าวมา อาจใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ ในการสกัดได้ เช่น เฮกเซน ปิโตรเลียมอีเธอร์ เพื่อขจัดสารพวกไขมันออกไปก่อน และต้องระเหยเอาน้ำยาสกัดเหล่านี้ออกไปจนหมดก่อนทำการสกัดขั้นต่อไป

2.2.3 วิธีสกัด

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัดคุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้แต่ละวิธีมีขอดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

2.2.3.1 Maceration เป็นวิธีการสกัดสาระสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือ โถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 3 – 5 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะให้หมด (Exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดหลาย ๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก แต่วิธีนี้จะสกัดสารออกมาไม่สมบูรณ์ เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของน้ำยาสกัด เกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพร และน้ำยาที่ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง

2.2.3.2 Percolation เป็นวิธีสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่าเพอร์โคเลเตอร์ (Percolator) โดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้นทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อย ๆ บรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขสารสกัดออกโดยค่อย ๆ เติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรไว้อย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์บีบกาก เอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันแล้วนำไปกรองวิธีนี้มีข้อดีสำหรับการสกัดสมุนไพรแบบสมบูรณ์ และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่เปลืองน้ำยาสกัด และใช้เวลาในการสกัดนาน จึงอาจต้องดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารโดยเพิ่มเพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัวและให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

2.2.3.3 Soxhlet Extractor คือ การสกัดด้วยระบบซอกซ์เลต เป็นวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในฟลาสก์ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ ซึ่งการสกัดเป็นระบบปิด น้ำยาสกัดจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งองค์ประกอบของสมุนไพรถูกสกัดออกมา เมื่อน้ำยาสกัดในเอ็กซ์แทรกติงแซมเบอร์ (Extracting Chamber) สูงถึงระดับการกักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงมาในฟลาสก์วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ เป็นการสกัด ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้น้ำยาสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง แต่ไม่เหมาะกับสารสำคัญที่ไม่ทนต่อความร้อน และน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสมเพราะเกิดการแยกตัวของตัวทำละลายแต่ละชนิด มีผลทำให้สัดส่วนของน้ำยาสกัดแตกต่างไปจากเดิมและผลการสกัดไม่ดีเท่าที่คาดไว้

2.3 เทคนิคการวิเคราะห์และแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพร

2.3.1 เทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography)

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันที่ได้ผลดีมากและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (Distribution of Partition) ของสารแต่ละชนิดระหว่าง 2 วัฏภาค ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ซึ่งอาจเป็นแก๊ส หรือของเหลว กับอีกวัฏภาคหนึ่งซึ่งเป็นวัฏภาคอยู่กับที่ (Stationary Phase) อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง (Supporting Material) ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารตัวอย่าง เช่น ขนาดโมเลกุล ความมีประจุ เป็นต้น มีความจำเพาะเจาะจงต่อวัฏภาคทั้งสอง จากความแตกต่างนี้ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (Qualitative and Quantitative Analysis) ได้ ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี คือ ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสมตรวจความสม่ำเสมอของสารตัวอย่าง ทำสารให้บริสุทธิ์ ตรวจเอกลักษณ์ของสาร ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ และตรวจสารปนเปื้อน เทคนิคโครมาโทกราฟีที่นำมาใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีอยู่หลายชนิด ดังนี้

2.3.1.1 เทคนิครงคเลขผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

TLC เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของสารระหว่างวัฏภาคอยู่กับที่ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็งและตัวทำลายซึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านตัวดูดซับ จึงจัดเป็น Solid–liquid Adsorption Chromatography แต่เดิมใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และใช้พิสูจน์สารโดยเปรียบเทียบ R_f ของสารกับสารแท้ (Authentic Sample) นอกจากนี้ ยังใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมากโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชนิดของตัวดูดซับ ได้แก่ ซิลิกาเจล (Silica gel, $SiO._2xH_2O$) อะลูมินาคิเซลกัวร์ (Kieselguhr) และผงเซลลูโลส (Cellulose) เป็นต้น ตัวดูดซับเหล่านี้มักมีสารเรืองแสงผสมอยู่ เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยมองภายใต้แสงยูวี (UV) วิธีการของเทคนิครงคเลขผิวบาง แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมแผ่น TLC
2) การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC
3) การพัฒนาให้เกิดการแยกสารบนแผ่น TLC (Development of TLC Plate)
4) การตรวจหาจุดบนแผ่น TLC (Visualization)
5) การคำนวณหาค่า R_f
6) การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยใช้แผ่น TLC

2.3.1.2 เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography, CC)

CC เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกสารต่าง ๆ มากมายหลายชนิด อาทิ การแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถปรับขนาดคอลัมน์ให้เหมาะกับปริมาณสารที่ต้องการแยกได้ โดยมีวัฏภาคอยู่กับที่เป็นของแข็ง เช่น ซิลิกาเจล บรรจุอยู่ในคอลัมน์ยาว จากนั้นจึงเติมสารผสมที่ต้องการแยกลงไปด้านบนของคอลัมน์ก่อนที่จะผ่านตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ลงไปเพื่อทำให้เกิดการแยกวัฏภาคอยู่กับที่จะมีแรงดึงดูดกับสารชนิดต่าง ๆ ด้วยความแรงต่างกัน ซิลิกาเจลมีความมีขั้วสูงจึงมีแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วมาก ๆ ได้แข็งแรงกว่าสารไม่มีขั้ว ดังนั้นตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่จึงชะสารต่างชนิดออกมาไม่พร้อมกัน ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดว่าสารตัวอย่างจะออกมาเร็วหรือช้าอย่างไรและการแยกจะเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ ได้แก่ แรงดึงดูดระหว่างสารตัวอย่างกับวัฏภาคอยู่กับที่ การละลายของสารตัวอย่างในวัฏภาคเคลื่อนที่ และมวลโมเลกุล

2.3.2 เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (Mass Spectrometry, MS)

MS เป็นวิธีการใช้สเปกตรัมที่ได้จากการระเหยตัวอย่างเข้าไปในระบบที่มีความดันต่ำสารจะถูกไอออนไนซ์ เกิดการแตกตัวของพันธะได้ไอออนที่มีประจุบวก ซึ่งจะถูกเร่งในสนามแม่เหล็กและการกระจายตัว ทำให้สามารถวัดปริมาณไอออนสัมพัทธ์ได้เป็นมวลต่อประจุ (Mass/Charge) MS สามารถระบุข้อมูลทางโครงสร้างของสารประกอบแต่ละชนิด ซึ่งสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้แน่ชัด แต่ไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ จึงนำเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) มาร่วมในการวิเคราะห์เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลและส่วนประกอบของธาตุต่าง ๆ ในสารผสม (Chanakul, et al., 2006)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ (Chattopadhyay, et al., 2008) โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบไนโตรเจน และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) (Velioglu, et al., 1998) บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารและยา ได้พยายามพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง (Chattopadhyay, et al., 2008)

อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สอง คือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤกษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) กลูตาไธโอน-เพอรอกซิเดส (Glutathione Peroxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase) หรือสารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (Albumin) บิลิรูบิน (Bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (Ceruloplasmin) กลูตาไธโอน (Glutathione) ทรานสเฟอริน (Transferrin) ยูบิควินอล (Ubiquinol) และ ยูเรต (Urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมดจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative Stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของรางก่าย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง

2.4.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผัก เครื่องเทศ องุ่น และสมุนไพรได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

2.4.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic Antioxidants)

สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ Propyl Gallate, 2- Butylated Hydroxyl Anisole, 3 -Butylate Hydroxyanisole, Butylated Hydroxytoluene (BHT) และ Tertiary Butyl Hydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิด ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และ รสชาติที่เปลี่ยนไป

สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang, et al., 2000)

2.4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural Antioxidants)

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่า มีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (Non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) เช่น แซนโธน (Xanthone) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (Aromatic Hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (Functional Group) เหล่านี้ มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ Ortho-dihydroxyl Phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชั่น คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) (Sanchez-Moreno, et al., 2000)

2.4.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงาน ของสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีหลายกลไก ได้แก่ ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) ยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet Qxygen Quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Metal Chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain- breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (Enzyme Inhibition)

2.4.3 การสกัดและการตรวจสอบฤทธิ์ของสารในอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่เป็น สารประกอบฟีนอลิก สารกลุ่มนี้มีหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Tocopherol, Tocotrienol, Oryzanols (Lai, et al., 2007), Caffeic acid, Syring acid, Rutin, Epicatechin, Catechin, Gallic acid, Vanilic acid, p-Coumaric acid, Feruric acid และ Quercetin (Que, et al., 2007) รวมทั้งสารฟลาโวนอยด์ (Vichitphan, et al., 2007; Ramamoorthy & Bono, 2007) โดยทั่วไปการสกัดสารประกอบฟีนอลิกมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีความแตกต่างกันตามแต่ลักษณะและองค์ประกอบของสาร ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ น้ำ เมทานอล (Methanol) เอทานอล (Ethanol) เอธิล-อะซิเตต (Ethyl acetate) (Ramamoorthy & Bono, 2007; Lai, et al., 2007) และตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}), อะซีโตน (Acetone, C_3H_6O), คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$), ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) หรือ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbontetracloride, CCl_4) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระมักประกอบด้วยสารหลายชนิดที่ทำงานเสริมกันจึงจะมีประสิทธิภาพสูงในการทำงาน ปัจจุบันพบว่าพืชผักและผลไม้ที่มีสี เช่น สีแดง ดำ หรือ ม่วง จะมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง (Zhang, et al,. 2006)

วิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์สารต้าน อนุมูลอิสระมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความจำเพาะต่อสารแตกต่างกัน โดยปกติแล้วการตรวจสอบมักจะสรุปผลจากหลายวิธีร่วมกัน เพื่อทำให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องยิ่งขึ้น การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน มีหลายวิธี ไดแก

2.4.3.1 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer, HAT) เช่น วิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC) และวิธี Total Radical–Trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

2.4.3.2 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron Transfer, ET หรือ SET) เช่น วิธี Diphenyl–1 –picrylhydrazyl assay (DPPH) (Que, et al., 2007), วิธี The Ferric Reducing Ability of Plasma Assay (FRAP) (Alia, et al., 2003; Ramamoorthy & Bono, 2007) วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), Lipid Peroxidation Reducing Power และ Metal Chelating Ability (Lai, et al., 2007)

ส่วนเครื่องมือที่นิยมใช้ในการตรวจหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับความนิยมคือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Vichitphan, et al., 2007; Lai, et al., 2007)

ในการศึกษานี้จะใช้วิธี DPPH scavenging assay โดยอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัวมีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แลว โดยไมตองทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ การวัดทำโดยใช้เครื่องสเปคโตรสโกปี (Spectroscopy) วัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูล (Antioxidant; AH) ลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ดังสมการที่ [1]

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \quad \cdots\cdots\cdots [1]$$

ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50 % Effective Concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ให้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ เหลืออยู่ 50 % (Lo & Cheung, 2005) โดยคำนวณ % DPPH Scavenging ดังสมการที่ [2]

$$\%\ DPPH\ scavenging = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} x\,100 \quad \cdots\cdots\cdots [2]$$

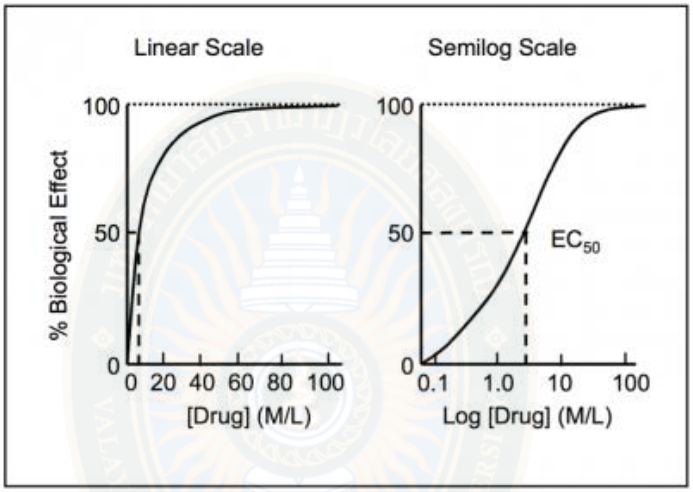
วิธีนี้มีข้อดี คือ ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้น ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุมแคโรตินอยดที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน แต่ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัวไมไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย

ดังนั้นวิธีนี้จึงไมสามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได นอกจากนี้ โครงสร้างทางเคมีของ $DPPH^{\bullet}$ ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมูไนโตรเจนทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไมสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยา

ขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้ง ๆ สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซสามารถทำให้สี DPPH$^{\bullet}$ จางลงไดอีกด้วย

2.4.4 หลักการคำนวณค่า EC_{50}

ในการคำนวณหาค่า EC_{50} โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับการตอบสนองที่เกิดขึ้นในรูปของ % DPPH Scavenging ซึ่งลักษณะกราฟที่ได้นี้เรียกว่า “Concentration–effect Curve” หรือ “Dose-response Curve”



ภาพที่ 2.2 The Concentration-effect Curve. เมื่อทำการสร้างกราฟบน Linear Scale (ซ้าย) และเมื่อทำการสร้างกราฟบน Semi-log Scale (ขวา)
ที่มา: Rang, H.P., Dale, M.M., & Ritter, J.M., 2000)

การสร้างกราฟระหว่างค่า Log ความเข้มข้นของสารทดสอบกับการตอบสนองที่เกิดขึ้นบน Semi-log Scale เป็นที่นิยมในการคำนวณหาค่า EC_{50} มากกว่าแบบ Linear Scale เพราะค่า Log ความเข้มข้นบนแกน x มีการกระจายของ Scale มากกว่า ทำให้การคำนวณหาค่า EC_{50} ทำได้ง่ายและถูกต้องแม่นยำกว่า

2.5 การสอนเชิงปฏิบัติการ (Laboratory)

การสอนแบบปฏิบัติการ (Leite, L., & Dourado, L., 2013) คือ การสอนที่ให้ผู้เรียนกระทำกิจกรรมการเรียน โดยเน้นให้ผู้เรียนได้ลงมือปฏิบัติด้วยตัวเอง ทำการทดลองฝึกการใช้ทฤษฎีโดยผ่านการสังเกตการทดลอง ให้เกิดประสบการณ์ตรง โดยมีครูผู้สอนคอยให้คำแนะนำอย่างใกล้ชิด

2.5.1 จุดมุ่งหมายในการเรียนการสอนโดยปฏิบัติการทดลอง

1) เพื่อปลูกผังให้เกิดความสนใจ ทัศนคติ ความพึงพอใจ ความมีใจกว้างและความอยากรู้อยากเห็นในวิชาวิทยาศาสตร์

2) เพื่อพัฒนาความคิดริเริ่มสร้างสรรค์และความสามารถในการแก้ปัญหา

3) เพื่อส่งเสริมการคิดแบบวิทยาศาสตร์และวิธีการทางวิทยาศาสตร์

4) เพื่อพัฒนาความเข้าใจเกี่ยวกับมโนทัศน์และคามสามารถทางสติปัญญา

5) เพื่อพัฒนาความสามารถทางการปฏิบัติ

2.5.2 ความสำคัญของการปฏิบัติการทดลองและห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

2.5.2.1 ความสำคัญของการปฏิบัติการทดลอง

ในการทำปฏิบัติการวิทยาศาสตร์หรือการฝึกฝนทักษะในวิชาอื่น ๆ ไม่เพียงแต่จะฝึกฝนความชำนาญของกล้ามเนื้อหรืออวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายเท่านั้น ยังรวมถึงการฝึกทักษะในการแก้ปัญหา การรวบรวมรายละเอียดเพื่อให้เกิดมโนทัศน์ และก่อให้เกิดทัศนคติที่ดีในวิชานั้น ๆ อีกด้วย

การเรียนการสอนโดยการปฏิบัติการทดลองไว้พอสรุปได้ดังนี้

1) ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เป็นแหล่งของปัญหาต่าง ๆ ที่จะให้นักเรียนได้แก้หรือพยายามแก้

2) ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์จะช่วยให้นักเรียนได้ทราบคำตอบของปัญหาที่นักเรียนได้พบในห้องเรียนหรือจากที่อื่น ๆ

3) การปฏิบัติการทดลองวิทยาศาสตร์จะช่วยส่งเสริมความเข้าใจของนักเรียนในบทบาทของนักวิทยาศาสตร์ที่มีต่อสังคม

4) การปฏิบัติการทดลองวิทยาศาสตร์ แสดงให้เห็นถึงปรากฏการณ์ต่าง ๆ หลักการและการนำหลักการไปใช้ ซึ่งหมายถึง ข้อเท็จจริง กฎ และข้อสรุปต่าง ๆ ทางวิทยาศาสตร์

5) การปฏิบัติการทดลองวิทยาศาสตร์ ช่วยให้นักเรียนมีความรู้ความเข้าใจในข้อเท็จจริง หลักการ มโนทัศน์ และข้อสรุปต่าง ๆ ของวิชาวิทยาศาสตร์

6) การปฏิบัติการทดลองช่วยพัฒนาทักษะต่าง ๆ นิสัยในการทำงานและทัศนคติ

สำหรับวิชาเคมีในการทำปฏิบัติการทดลองจะช่วยให้ผู้เรียนมีความสามารถในด้านต่าง ๆ สรุปความสามารถที่ได้จากการปฏิบัติการทดลองเคมีไว้ดังนี้

1) ด้านการสื่อความหมาย (Communication)

2) ด้านการสังเกต (Observation)

3) ด้านการสืบสอบ (Investigation)

4) ด้านการรายงานผล (Reporting)

5) ด้านการใช้เครื่องมือ (Manipulative)

6) ด้านความมีระเบียบ (Discipline)

2.5.2.2 ความสำคัญของห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

ห้องปฏิบัติการเป็นสถานที่ที่เหมาะสมที่สุดแห่งหนึ่งสำหรับการสอน และการเรียนวิทยาศาสตร์ เพราะเด็กนักเรียนสามารถจะสร้างปัญหา ตั้งสมติฐานและความสามารถทดสอบได้ โครงสร้าง หน้าที่ ละประโยชน์ที่พึงได้รับจากห้องปฏิบัติการ สรุปได้ดังนี้

1) ห้องปฏิบัติการจะมีลักษณะเป็นแหล่งการสำรวจและการค้นคว้า (Exploration) สำหรับเด็กที่จะศึกษาเล่าเรียน โดยอาศัยหลักการสังเกต

2) ห้องปฏิบัติการจะเป็นศูนย์ปฏิบัติการ (Operation) ให้เด็กได้ลงมือกระทำและเก็บข้อมูล

3) ห้องปฏิบัติการจะเป็นห้องทดลองเพื่อพิสูจน์ในเชิงอนุมาน (Deductive Verification) โดยให้เด็กได้ใช้เครื่องมือทำการ ชั่ง วัด ตวง ปริมาณของสิ่งต่าง ๆ และนำข้อมูลที่ได้ไปตรวจสอบ โดยการใช้สูตร และสมการตามที่ได้รับการยอมรับนับถือแล้ว

4) ห้องปฏิบัติการจะเป็นศูนย์ของกระบวนการสืบเสาะหาความรู้ (Inquiry) เพื่อให้เด็กมีโอกาสศึกษาค้นคว้า อธิบายปรากฏการณ์ต่าง ๆ อย่างมีอิสระ และให้มีความสอดคล้องกับแนวความคิดหรือมโนทัศน์ที่กำลังศึกษากันอยู่

5) ห้องปฏิบัติการจะเป็นแหล่งให้เด็กฝึกฝนเกี่ยวกับกระบวนการ (Process) เพื่อนำวิธีการทดลองและการประเมินผลไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

นอกจากนี้ยังได้กล่าวถึงประโยชน์ที่จะได้รับจากห้องปฏิบัติการ 3 ประการ คือ

1) การใช้ห้องปฏิบัติการจะช่วยให้เด็กเรียนรู้ในเรื่องสำคัญ ๆ มากกว่าจะเน้นให้เด็กรู้เฉพาะเนื้อหาวิชาที่สอนเท่านั้น และยังส่งเสริมเด็กมีทัศนคติที่ดีต่อวิทยาศาสตร์ทุก ๆ สาขาวิชาอีกด้วย

2) ประสบการณ์ที่เด็กได้รับจากห้องปฏิบัติการ จะมีคุณประโยชน์มากกว่าการสอนโดยการบรรยาย หรือการสาธิต เพราะการทดลองจะช่วยให้เด็กได้รับประสบการณ์ตรง

3) การสอนโดยการบรรยาย สาธิตและการทดลอง จะทำให้เด็กได้รับความรู้ จากเนื้อหาวิชาเท่าเทียมกัน เมื่อทำการทดสอบด้วยการสอบข้อเขียน

2.5.3 การสอนเพื่อให้เกิดทักษะและทักษะปฏิบัติในการทดลองวิทยาศาสตร์

2.5.3.1 การสอนเพื่อให้เกิดทักษะ

การที่บุคคลสามารถที่จะเรียนรู้ในการทำสิ่งต่าง ๆ นอกจากจะต้องอาศัยแรงจูงใจ มโนทัศน์ การแก้ปัญหา ความคิดวิพากษ์วิจารณ์ ความคิดสร้างสรรค์และทัศนคติแล้ว ยังต้องอาศัยทักษะในการทำงาน ทักษะเป็นเรื่องที่สำคัญที่ช่วยให้การทำงานที่คล่องแคล่ว มีประสิทธิภาพ วิธีที่จะช่วยให้เกิดทักษะก็คือ การสาธิต และการอธิบายแนะนำ ซึ่งมีลำดับขั้นตอนดังนี้

1) บอกให้เด็กทราบว่าจะทำอะไร ชี้แจงให้เห็นความสำคัญ เพื่อเร้าให้เด็กเกิดความสนใจ และกระตุ้นให้เห็นว่า สิ่งนั้นมีความจำเป็นสำหรับตนอย่างไร ต่อจากนั้นจึงสาธิตให้ดูตั้งแต่ต้นจนจบ

2) ให้เด็กได้มีโอกาสได้ฝึกหัดทันที หลังจากการสาธิต สิ่งที่ต้องคำนึงคือการทำซ้ำและการเสริมแรง

3) ในขณะที่ฝึกหัด ให้คำแนะนำ เพื่อช่วยให้เด็กทำทักษะนั้น ๆ ได้ด้วยตนเอง

4) ให้คำแนะนำในขณะที่อยู่ในบรรยากาศที่สบาย ๆ ไม่วิจารณ์เด็กโต ๆ บางคนมักจะกลัวความผิด กลัวทำไม่ได้ จึงมักจะทำผิดพลาด ครูจะต้องใจเย็น ๆ ไม่ดุ บรรยากาศที่ไม่ตึงเครียด จะยั่วยุให้เด็กเกิดความพยายามที่จะลอง

5) ในการฝึกหัด การเน้นสิ่งที่ถูกเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ แต่บางครั้งการทำสิ่งที่ผิดพลาดจนเกินกว่าเหตุ ก็จะช่วยแก้ไขข้อผิดให้ถูกได้

2.5.3.2 ทักษะปฏิบัติในการทดลองวิทยาศาสตร์

ทักษะ หมายถึง ความชำนาญ มีผีมือหรือความสันทัดในเชิงงานในการปฏิบัติการวิทยาศาสตร์จะต้องมีการหยิบจับเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ ทักษะปฏิบัติการในการทดลองวิทยาศาสตร์จึงหมายถึง ความชำนาญ มีผีมือหรือความสันทัดในการปฏิบัติการทดลอง ทั้งการหยิบจับเครื่องมือ การใช้เครื่องมืออย่างถูกวิธี การระมัดระวัง และการรักษาเครื่องมือในขณะทำการทดลอง ตลอดจนมีเทคนิคต่าง ๆ ในการทดลอง เช่น การรินสารละลาย การเขย่าสารละลาย การดมสาร อย่างดีระมัดระวังความปลอดภัยของตนเองและผู้อื่น

การมีทักษะในการปฏิบัติการทดลองจะทำให้เกิดประโยชน์ดังนี้

1) มีความปลอดภัย การใช้วัสดุอุปการณ์ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการนั้นจำเป็นต้องเรียนรู้ถึงวิธีการใช้ที่ถูกต้องและมีทักษะ ซึ่งจะช่วยให้ตนเองและผู้อื่นปลอดภัยจากอุบัติเหตุที่จะเกิดขึ้นจากการปฏิบัติการทดลอง

2) ความมีประสิทธิภาพในการทดลอง การเลือกใช้วัสดุอุปกรณ์ที่เหมาะสมและถูกต้อง จะทำให้การทดลองดำเนินไปด้วยดี รวดเร็ว และแม่นยำ แต่ถ้าเลือกอุปกรณ์ไม่เหมาะสมและไม่มีทักษะในการใช้ จะทำให้ผลการทดลองผิดพลาดมาก

3) ผลทางเศรษฐกิจ การมีทักษะในการปฏิบัติการทดลองจะช่วยประหยัดงบประมาณในการซื้ออุปกรณ์และสารเคมี เพราะถ้าใช้เครื่องมือบางชิ้นและสารเคมีบางชนิดมีราคาแพงมาก การใช้ไม่ถูกวิธี นอกจากก่อให้เกิดอันตรายแล้ว อาจทำให้เครื่องมือชำรุดเสียหายใช้การไม่ได้ ต้องจัดซื้อมาใหม่ ทำให้เสียงบประมาณไปมีผลต่อเศรษฐกิจของประเทศด้วย

กิจกรรมต่าง ๆ ในห้องเรียนวิทยาศาสตร์และการปฏิบัติการทดลอง ทำให้นักเรียนมีพัฒนาการในการใช้ทักษะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1) การรู้จักแก้ปัญหา

2) การเลือกใช้และวิธีการที่เหมาะสมในการรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับปัญหา

3) การใช้เครื่องมือ

4) การสรุปข้อวินิจฉัย หลักการ และมโนทัศที่ได้จากข้อมูล

5) การนำความรู้เดิมไปทำนายสิ่งที่พบใหม่

6) การนำความรู้ที่ได้ไปใช้

7) การเสนอรายงานผล

2.5.4 กิจกรรมการปฏิบัติการทดลอง

2.5.4.1 จุดมุ่งหมายของกิจกรรมปฏิบัติการทดลองในวิชาวิทยาศาสตร์ทั้ง 3 ด้านตามจุดมุ่งหมายของการเรียนการสอนนี้คือ

1) ด้านความคิด (Cognitive) มีจุดมุ่งหมายเพื่อ

a. ส่งเสริมพัฒนาการทางความคิด

b. ส่งเสริมการเรียนรู้มโนทัศน์ทางวิทยาศาสตร์

c. พัฒนาความคิดสร้างสรรค์
d. พัฒนาทักษะการแก้ปัญหา
e. เพิ่มความเข้าใจในวิชาวิทยาศาสตร์และวิธีการทางวิทยาศาสตร์

2) ด้านการปฏิบัติ (Practical) มีจุดมุ่งหมายเพื่อ
a. พัฒนาทักษะการสืบสอบ
b. พัฒนาทักษะการวิเคราะห์ข้อมูล
c. พัฒนาทักษะการเสนอรายงาน
d. พัฒนาทักษะการทำงานรวมกับผู้อื่น

3) ด้านความรู้สึก (Affective) มีจุดมุ่งหมายเพื่อ
a. ส่งเสริมให้มีทัศนคติที่ดีต่อวิทยาศาสตร์
b. ส่งเสริมการยอมรับและเข้าใจบุคคลอื่น

2.5.4.2 กิจกรรมการปฏิบัติการทดลองมีส่วนช่วยให้ผู้เรียนมีความเข้าใจยอมรับนับถือในธรรมชาติของวิทยาศาสตร์ ส่งเสริมพัฒนาการทางสติปัญญา การมีพัฒนาการทางด้านมโนทัศน์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การพัฒนาทัศนคติต่อวิทยาศาสตร์ในเชิงนิมาน (Positive) และแบ่งพฤติกรรมการปฏิบัติการทดลองในวิชาวิทยาศาสตร์ไว้ 4 ด้าน คือ

1) การวางแผนการออกแบบการทดลอง (Planing and Desing) ได้แก่ การตั้งคำถาม การทำนายผลการทดลอง การตั้งสมมติฐาน การออกแบบวีดำเนินการทดลอง

2) การปฏิบัติการทดลอง (Preformance) ได้แก่ การดำเนินการทดลอง การใช้เครื่องมือ การสังเกต และการจดบันทึกข้อมูล

3) การวิเคราะห์และแปรผล (Analysis and Interpretation) ได้แก่ การจัดการกระทำข้อมูล การอธิบายความสัมพันธ์ การสรุปหลักการทั่วไป การตรวจความถูกต้องของข้อมูลกำหนดข้อตกลงและขอบเขต การตั้งคำถามจากผลการทดลอง

4) การนำความรู้ไปใช้ (Appliation) ได้แก่ การทำนายสถานการณ์ใหม่ การตั้งสมมติฐาน โดยอาศัยผลที่ได้จากการทดลอง การนำเทคนิคต่าง ๆ ในการปฏิบัติการทดลองไปใช้แก้ปัญหาใหม่

2.5.4.3 การประเมินผลทักษะปฏิบัติในการทดลองวิทยาศาสตร์ พฤติกรรมต่าง ๆ ที่จะต้องประเมินในวิชาวิทยาศาสตร์ 5 พฤติกรรม ดังนี้

1) ความรู้ความเข้าใจ (Knowledge and Comprehension)

2) กระบวนการสืบเสาะหาความรู้ทางวิทยาศาสตร์ (Process of Scientific Inquiry)

3) การนำความรู้และวิธีการทางวิทยาศาสตร์ไปใช้ (Application of Scientific Knowledge and Methods)

4) ทัศนคติและความสนใจ (Attitudes and Interests)

5) ทักษะภาคปฏิบัติ (Manual Skills)

6) โดยมีเกณฑ์ในการประเมินจากพฤติกรรมในด้านต่าง ๆ ดังนี้

7) การวางแผนการทดลองออกแบบการทดลอง (Planing and Desing)

8) ทักษะปฏิบัติในห้องการทดลอง (Manipulative Dkills)

9) การดำเนินการทดลอง (Conduct of Experiment)

10) การสังเกต (Observation)

11) การจดบันทึกข้อมูล (Recording Data)

12) การแปลความหมายของข้อมูลจาดการทดลอง (Interpretation of Data and Experiment)

13) ความรับผิดชอบ (Responsibility)

14) ความคิดริเริ่มที่จะทำสิ่งใหม่ ๆ (Initiative)

15) นิสัยในการทำงาน (Work Habits)

การประเมินผลด้านการปฏิบัตินั้น จะกระทำโดยใช้แบบทดสอบหรือข้อเขียนแต่เพียงอย่างเดียว เหมือนการประเมินผลด้านการรับรู้และความคิดไม่ได้ เพราะมีทักษะหลายอย่างที่ไม่สามารถทดสอบหรือวัดผลโดยวิธีเขียนตอบ เช่น ทักษะในการหยิบและใช้เครื่องมือ ทักษะในการสังเกต จึงต้องประเมินผลโดยการสังเกตจากการกระทำจริง ๆ ด้วยการกำหนดเกณฑ์ต่าง ๆ ขึ้นเพื่อให้คะแนนทักษะที่สามารถใช้เกณฑ์ประเมินผลด้านการปฏิบัติเป็นทักษะในการทำหรือปฏิบัติแบ่งได้ 2 พวก การประเมินทักษะทั้ง 2 พวกนี้จะต้องใช้วิธีสังเกตขณะนักเรียนกำลังปฏิบัติการทดลอง

1) ทักษะภาคปฏิบัติ เป็นทักษะที่สามารถสังเกตได้ ในขณะที่นักเรียนกำลังปฏิบัติการทดลองโดยตรง ดังนี้ คือ

a. ทักษะในการปฏิบัติการ (Manual Skills) ได้แก่ การหยิบจับวัสดุต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง และการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในการทดลอง

b. ทักษะในการสังเกต (Observation) ได้แก่ การสังเกต เพื่อค้นหารายละเอียดหรือเปรียบเทียบ และการสังเกตผลการทดลอง

c. ทักษะในการดำเนินการทดลอง (Carrying out Procedures) ได้แก่ การปฏิบัติตามวิธีการที่กำหนดไว้ในแบบหรือคู่มือการทดลอง และการเตรียมการหรือการคิดค้นวิธีการใหม่

2) ทักษะในการสื่อสารความหมายภาคปฏิบัติ เป็นทักษะในการบันทึกผลและใช้ผลการทดลองรวบรวม สรุปไว้ในสมุดบันทึกหรือรายงานการทดลอง คือ

a. ทักษะการบันทึกผล

b. ทักษะในการใช้ผลการทดลอง

2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 งานวิจัยในประเทศ

2.6.1.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร

ระวิวรรณ แกวอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพืชสมุนไพรที่พบทั่วไปในจังหวัดอุบลราชธานี 8 ชนิด ไดแก เหียง กระบก แมงลักคา หูเสือ เอนอา มะ

พอก มะสังและตูมกาขาว ด้วยการนำส่วนต่าง ๆ ของพืชมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเอทานอล ไดสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทและเอทานอลทั้งหมด 36 สารสกัด จากนั้นทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH Scavenging Assay พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไดสูงกว่าสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตท โดยมีร้อยละการยับยั้งอยู่ในช่วง 19.8+2.3 ถึง 51.4+1.3 เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้นเดียวกัน (500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีค่า Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) อยู่ในช่วง 4.4+7.2 ถึง 105.9+4.3 มิลลิกรัมวิตามินซี/100 กรัมสารสกัด สวนการหาปริมาณสารฟนอลรวมของสารสกัดชั้นเอทานอลโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu พบว่าปริมาณสารฟนอลรวมในสารสกัดนี้จะอยู่ในช่วง 5.4+0.1 ถึง 41.5+0.3 มิลลิกรัมกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลรวมกับการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แฉล้ม มาศวรรณา และคนอื่น ๆ (2554) ศึกษาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระสองชนิด คือ สารแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่อยู่ในกระเจี๊ยบแดง 6 สายพันธุ์ โดยได้ทำการสกัดสารทั้งสองชนิดจากกลีบกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล อัตราส่วน 15 ต่อ 85 และน้ำร้อน ผลการศึกษาพบว่ากระเจี๊ยบแดงพันธุ์ขอนแก่น ลพบุรี และซูดาน มีปริมาณสารแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เหมาะสำหรับการใช้ประโยชน์เป็นเครื่องดื่มและอาหาร โดยพบว่า มีปริมาณสาร แอนโท-ไซยานินสูงที่สุดเมื่อสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล และสกัดด้วยน้ำร้อน โดยให้ค่าอยู่ระหว่าง 126–135 มิลลิกรัม/100 กรัม Dry Weight (DW) แต่เมื่อสกัดด้วยเอทานอล พบว่ากระเจี๊ยบแดงพันธุ์ขอนแก่นเท่านั้นที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 75.8+0.15 มิลลิกรัม/100 กรัม DW ในทำนองเดียวกัน เมื่อวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กระเจี๊ยบแดงพันธุ์ขอนแก่น ลพบุรี และซูดานที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ค่าฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ระหว่าง 2,143–2,293 มิลลิกรัม/100 กรัม DW แต่เมื่อสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริคในเอทานอล พบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงพันธุ์ขอนแก่นให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด 2,105+84.0 มิลลิกรัม/100 กรัม DW และเมื่อสกัดด้วยเอทานอล กระเจี๊ยบแดงพันธุ์ซูดานเท่านั้นที่มีปริมาฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด 469+50.4 มิลลิกรัม/100 กรัม DW อย่างไรก็ตามตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณของแอนโทไซยานินและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เป็นการใช้น้ำร้อนที่เวลา 15 นาที ซึ่งให้ปริมาณสารแอนโทไซยานินและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใกล้เคียงกับการใช้กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคนอื่น ๆ (2554) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเมทานอล และศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทในหนูขาว โดยสกัดสารด้วยวิธีเปอร์โคเลชันด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองด้วย DPPH Scavenging Assay, ABTS Assay และ FRAP Assay ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิกที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดด้วยความร้อน ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในสัตว์ทดลองโดยเหนี่ยวนำให้หนูขาวเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ในวันสุดท้ายหลังได้รับสารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทในขนาด 100, 200 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทุกวันนาน 28 วัน ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบ

ฟีนอลิกรวมสูงสุดคือ 120.44±0.01 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ผลการศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระพบค่า IC_{50} เท่ากับ 12.32 ± 0.28 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม เมื่อทดสอบด้วย DPPH Scavenging Assay และมีค่า TEAC เท่ากับ 26.02 ± 1.92 มิลลิโมลาร์/มิลลิกรัม เมื่อทดสอบด้วย ABTS Assay ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay มีค่า FRAP Value 1.16 ± 0.05 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัม สารสกัดเหง้าข่าลิงชั้นเอทิลอะซิเตทสามารถลดการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิกที่ถูกเหนี่ยวนำโดยความร้อนในขณะเก็บได้

ทัศนีย์ วัฒนชัยยงค์ และสวรักษ์ จันทรเทพธิมากุล (2555) ได้ศึกษาและประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์พร้อมดื่มจากกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่บรรจุในขวดแก้วฝาเกลียวล็อกและผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาเก็บรักษานานขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมี โดยค่าสีมีแนวโน้มลดลง แต่ค่าความเป็นกรด-เบส มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เวลาเก็บนานขึ้นและอุณหภูมิสูงขึ้นยังมีผลต่อสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน คือ ที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 281.57-321.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 8.46-9.83 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า IC_{50} เท่ากับ 1.56-1.76 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 278.42-321.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 6.90-9.83 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า IC_{50} เท่ากับ 1.53-1.65 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชลดา จัดประกอบ และคนอื่น ๆ (2556) ได้ศึกษาวิจัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้า หรือ *Phellinus rimosus* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดราที่อยู่ในวงศ์ Hymenochaetaceae ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ทางยาและมักพบในเขตภาคอีสาน ตามภูมิปัญญาดั้งเดิมทางการแพทย์แผนไทยได้มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยารักษามะเร็ง รักษาโรคเริม รักษาอาการปวดหู และอาการผื่นคันปวดแสบปวดร้อน ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้าที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำ และการสกัดแอลคาลอยด์ ด้วย DPPH Scavenging Assay และ FRAP

2.6.1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฮว่านง็อก

เบญจพร ศรีสุวรมาศ และคนอื่น ๆ (2551) การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสมุนไพรพญาวานรโดยการมีส่วนร่วมของผู้ใช้สมุนไพร การทำสารสกัดหยาบ จากราก ลำต้น ใบ และทั้งต้นของสมุนไพรพญาวานร นำไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Sulmonella spp, E.coli, Stapphyllococcus aureus* และ *Shigella spp.* โดยวิธีวงกระดาษกรอง (Disk Diffusion Test) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบและทั้งต้น ทำให้เกิดบริเวณใส (Clear zone) บนจานเลี้ยงเชื้อ *Sulmonella* spp. และ *E.coli* เท่านั้น ที่ความเข้มข้น 1:10 โดยเกิดบริเวณใสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.50 ซ.ม. และ 2.22 ซ.ม. ตามลำดับ พร้อมทั้งทำการสัมภาษณ์แบบเจาะลึกผู้ใช้สมุนไพรชนิดนี้ในการรักษาโรคต่าง ๆ จาก 5 อำเภอของจังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 200 คน เป็นผู้ชาย 32.86 % และเป็นผู้หญิง 64.14 % มีอายุตั้งแต่ 4 ปี ถึง 90 ปี ประกอบอาชีพเกษตรกร ค้าขาย แม่บ้าน ข้าราชการ พระ และชาวบ้านทั่ว ๆ ไป มีทั้งยากจน ปานกลาง และร่ำรวย พบว่าผู้ใช้สมุนไพรตัวนี้

ในการรักษาโรคต่าง ๆ ถึง 22 โรค โดยใช้ตามคำบอกเล่าต่อ ๆ กันมา แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีเพียง 2 กลุ่มโรคเท่านั้นที่สัมพันธ์กับผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ คือ กลุ่มโรคทางเดินอาหาร และกลุ่มโรคผิวหนัง

สมหมาย ปะติตังโข (2553) ศึกษาการสกัดและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรพญาวานร โดยการนำใบแห้งแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล-อะซิเตต เมทานอล และเอทานอล แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Scavenging Assay และ FRAP Assay และทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรีย *E.coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp. และ Citrobacter spp.* พบว่าสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 656.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กด้วย FRAP assay สารสกัดทั้งหมดมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ใช้ โดยสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตท มีความสามารถในการรีดิวซ์ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดของเมทานอล ส่วนสารสกัดของเอทานอลและเฮกเซน เป็นตัวรีดิวซ์อย่างอ่อน สำหรับผลการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดของไดคลอโร-มีเทนและเมทานอลสามารถต้านการเจริญเติบโตของ *Klebsiella spp., Enterobacter spp.* และ *Citrobacter spp.* ได้ดี ในขณะที่สารสกัดจากเอทานอลต้านการเจริญเติบโตของ *Klebsiella spp.* และ *Citrobacter spp.* ได้ดี แต่ไม่มีสารสกัดชนิดใดที่สามารถต้านการเจริญเติบโตของ *E.coli* ได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสรุปว่า สารประกอบทุติยภูมิจากใบพญาวานรจึงน่าจะได้รับการพัฒนาเป็นยารักษาโรคปอดอักเสบชุมชน โรคอุจจาระร่วง และโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ

ศศมล ผาสุข และประเสริฐ มีรัตน์ (2557) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของสารสกัดหยาบฮว่านง็อก ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบใบและลำต้นฮว่านง็อกที่สกัดด้วยเอทานอลมีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 11.91 และ 2.32 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1.80 และ 1.64 mg of Gallic Acid/1 g of Sample ปริมาณแทนนินทั้งหมดเท่ากับ 1.85 และ 1.68 mg of Tannic Acid/1 g of Sample และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 40.52 และ 40.71 mg of rutin/1 g of sample ตามลำดับ ตรวจพบสารสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์และฟลาโวนอยด์ แต่ตรวจไม่พบแอลคาลอยด์ในใบและลำต้นฮว่านง็อก โดยสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 เซลล์ไลน์) มีค่า IC50 เท่ากับ 593 µg/ml ส่วนสารสกัดหยาบลำต้นฮว่านง็อกไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมมีค่า IC50 มากกว่า 5,000 µg/ml สารสกัดหยาบใบและลำต้นฮว่านง็อก มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco2 เซลล์ไลน์) มีค่า IC50 เท่ากับ 455 และ 620 µg/ml ตามลำดับ

2.6.1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์

หวานใจ โบบทอง (2556) ได้พัฒนาบทปฏิบัติการเคมี เรื่องจลนศาสตร์เคมี สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 โดยกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ ได้แก่ นักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 ภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2556 จำนวน 45 คน ที่ได้จากการสุ่มแบบเจาะจง เนื้อหาที่นำมาใช้ในบทปฏิบัติการเคมี คือ จลนศาสตร์เคมี สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ การทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม ที่เกี่ยวข้องกัน (t–test Dependent Samples) พบว่า บทปฏิบัติการเคมีที่พัฒนาขึ้น มีประสิทธิภาพตามเกณฑ์ที่กำหนด คือ 82.69/80.93 ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหลังการเรียนด้วยบทปฏิบัติการเคมีของนักเรียน ด้านความรู้ ความจำ ความเข้าใจ และการนำไปใช้ เรื่องจลนศาสตร์เคมี สูงกว่าก่อนเรียนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ผลสัมฤทธิ์ด้านทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์หลังเรียนด้วยบทปฏิบัติการเคมี สูงกว่าก่อนเรียนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ความคิดเห็นของนักเรียนที่เรียนด้วยบทปฏิบัติการเคมีเรื่องจลนศาสตร์ มีระดับความเห็นอยู่ในระดับมากทุกข้อคำถาม

2.6.2 งานวิจัยต่างประเทศ

2.6.2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร

อโตยูอิ และคนอื่น ๆ (Atoui & et al., 2005) ได้ทำการศึกษาตัวอย่างน้ำชาสมุนไพรแบบชงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดเอทิลอะซิเตทและใช้วิธี DPPH Scavenging Assay กับวิธี Chemiluminescence สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Quercetin และ Trolox เป็นสารมาตรฐาน พบว่า จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า Greek Mountain Tea และ Chinese Green Tea มีปริมาณของสารประกอบ ฟีนอลเท่ากับ 88.1±0.42 และ 1216±32.0 มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic Acid Equivalents ส่วนความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH พบว่า Chinese Green Tea มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.151±0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Quercetin (0.38 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ Trolox (0.57 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วน Greek Mountain Tea มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.77±0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Quercetin (0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ Trolox (0.13 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนวิธี Chemiluminescence รายงานผลเป็นค่า IC_{50} พบว่า Greek Mountain Tea และ Chinese Green Tea มีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.10\pm1.86\times10^{-2}$ กรัม/มิลลิลิตร (เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Quercetin 0.29 กรัม/มิลลิลิตร และ trolox 0.90 กรัม/มิลลิลิตร) และ $0.17\pm3.4\times10^{-3}$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Quercetin 1.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Trolox 5.89 ไมโครกรัม/

มิลลิลิตร) ตามลำดับ พบว่าสารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ สารสกัด *P. rimosus* โดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล

หงวนเหยียน และเอียน (Nguyen & Eun, 2011) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพรเวียดนาม 6 ชนิด ซึ่งมีใบฮว่านง็อกด้วย โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการ Reducing Power Metal Chelating และ DPPH Scavenging Assay ผลการศึกษาร้อยละของสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของสารสกัดด้วย Methanol มีปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น ๆ และสารสกัดที่มีปริมาณ Phenolic Content สูง จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

2.6.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฮว่านง็อก

เจียง และคนอื่น ๆ (Giang & et al., 2003) ได้แยกองค์ประกอบทางเคมีของใบฮว่านง็อกซึ่งเป็นพืชที่ชาวเวียดนามใช้เป็นยา พบว่าในใบฮว่านง็อกประกอบด้วยสารไฟโตสเตอรอล (Phytosterols), ไขมัน (Lipids), ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และ ซาโปนิน (Saponins) จากการวิเคราะห์ด้วย Qualitative Colour Reactions และเมื่อทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Medium Pressure Liquid Chromatography พบสารประกอบ n-pentacosan-1-ol; β-sitosterol, Stigmasterol and Their Corresponding 3-O-β-glucosides; Kaempferol 3-methyl Ether 7-O-β-glucoside and Apigenin 7-O-β-glucoside โครงสร้างของสารเหล่านี้วิเคราะห์ด้วย IR, UV, MS, 1 H NMR และ ^{13}C NMR

ชยรพ และคนอื่น ๆ (Chayarop & et al., 2011) ศึกษาเกี่ยวกับ Pharmacognostic Study และ Phytochemical Study ของใบฮว่านง็อก ได้รายงานลักษณะทางจุลชีววิทยา (Microscopic Characteristics) และ Physicochemical Properties อันได้แก่ Loss on Drying, Total ash, Acid-insoluble ash, และ Water Extractive Values รวมถึง Phytochemical Screening ด้วยวิธี TLC Fingerprint ของสารสกัดส่วนใบฮว่านง็อกที่สกัดด้วยเอทานอล พบองค์ประกอบของสารกลุ่ม ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ เทอปีนส์ เช่นเดียวกัน

ปาโมกข์ และคนอื่น ๆ (Pamok & et al., 2012) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ของการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ของใบมะรุมและใบฮว่านง็อก ซึ่งได้ทำการทดสอบฤทธิ์ความปลอดภัยของสารสกัดนี้ โดย Non-mutagenic Activity ก่อนทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต การศึกษานี้ทำการทดลองในเซลล์ไลน์ 3 ประเภท (HCT15, SW48, SW480) โดยสารสกัดมีความเข้มข้น 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ทดสอบความเป็นพิษด้วย 3'-(4,5 Dimethy-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT) Assay ผลพบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้ง 3 ประเภท สัมพันธ์กับความเข้มข้น และเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งยังพบอีกว่าสารสกัดจากใบมะรุม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มากกว่าสาร

สกัดจากใบฮว่านง็อก และสารสกัดจากใบมะรุมด้วยเอทานอล ให้ผลดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ทั้ง 3 ประเภท

ชานุดม และคนอื่น ๆ (Chanudom & et al., 2014) ศึกษาสารสกัดหยาบด้วยน้ำและเอทานอลของพืชสมุนไพร 13 ชนิด ซึ่งมีใบฮว่านง็อกเป็นหนึ่งในงานวิจัย ศึกษาเกี่ยวกับ ฟีนอลิกทั้งหมด คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และต้านจุลินทรีย์ โดยใช้ Folin–Ciocalteu ในการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ Antioxidant Assay Kit และคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค Disc Diffusion และ Borth Dilution ผลการศึกษาพบว่า สมุนไพรทั้ง 13 ชนิด มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด สัมพันธ์กับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีองค์ประกอบของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงจะมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง

2.6.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

คาลิส และซิมเซคลิ (Calis & Simsekli, 2012) รายงานว่า การเรียนรู้ด้วยการฝึกประสบการณ์หรือ การลงมือปฏิบัติทดลองเป็นหนึ่งกระบวนการที่สำคัญในการเรียนการสอนรายวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งผู้วิจัยได้ประเมินประโยชน์ที่นักเรียนระดับชั้นประถมศึกษาปีที่ 5 และระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 2 ได้รับจากการเรียนและปฏิบัติการทดลองรายวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมถึงหัวข้อและสาขาวิชาที่นักเรียนให้ความสนใจมากที่สุด ซึ่งจากการสำรวจพบว่ามีนักเรียนในเขตการศึกษา 9 โรงเรียน ระดับชั้นประถมศึกษาปีที่ 5 จำนวน 367 คน และระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 2 จำนวน 483 คน รวมทั้งสิ้นจำนวน 850 คน จึงทำการสัมภาษณ์นักเรียนโดยให้ระบุชื่อบทปฏิบัติการที่เคยได้ทำการทดลองในรายวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พร้อมทั้งสิ่งที่ได้เรียนรู้จากบทปฏิบัติการนั้น ๆ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ร้อยละ 98 ของนักเรียนที่เข้าร่วมงานวิจัย สามารถระบุชื่อบทปฏิบัติการได้ถูกต้อง โดยบทปฏิบัติการที่ทั้งสองชั้นเรียนเคยปฏิบัติ ได้แก่ รายวิชาฟิสิกส์ รายวิชาเคมี และรายวิชาชีววิทยา หัวข้อที่สนใจในแต่ละรายวิชาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการทดลองที่ใช้วัสดุอุปกรณ์ที่สามารถหาได้ง่าย และเป็นการทดลองที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในชีวิตประจำวัน

เซิฟเวอร์ ยูรูเมโซกลู และออกัสอันเวอร์ (Sever, S., Yurumezoglu, K., & Oguz-Unver, A., 2010) ทำการศึกษาวิจัยนักศึกษาคณะครุศาสตร์ชั้นปีที่ 2 จำนวน 148 คน เกี่ยวกับการชี้แจงบทปฏิบัติการแก่นักเรียน โดยการสาธิต (Demonstration Experiments) และโดยวีดีเทป (Videotaped Experiments) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงหลักสูตรการเรียนการสอนบทปฏิบัติการ ในบางโรงเรียนที่ขาดแคลนวัสดุอุปกรณ์ อาจนำสื่อวีดีโอเทปไปใช้แทนการชี้แจง บทปฏิบัติการแบบรายกลุ่มแทนได้ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการชี้แจงบทปฏิบัติการแก่นักเรียนโดยการสาธิตและโดยวีดีเทป จึงสรุปว่าสื่อวีดีโอเทปเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการชี้แจงบทปฏิบัติการแก่นักเรียนได้

โอโนราโต และแอมบรอสสิสา Onorato, P., & Ambrosisa, A., 2014) ศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์จากการใช้สื่อมัลติมีเดีย (Multimedia Tools) ในการเรียนการสอนหัวข้อแรงแม่เหล็ก (Magnetic Forces) ซึ่งถือเป็นหัวข้อรายวิชาฟิสิกส์ที่มีความซับซ้อนและยากต่อการทำความเข้าใจของนักเรียน ผู้วิจัยจึงออกแบบบทปฏิบัติการทดลอง หัวข้อแรงแม่เหล็ก ให้กับนักเรียนระดับมัธยมศึกษาจำนวน 150 คน ผลการศึกษาเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า นักเรียนมีความเข้าใจในทิศทาง และขนาดแรงแม่เหล็กเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ได้ก่อให้เกิดเครือข่ายคณะครูร่วมกับคณะผู้วิจัยที่มีความสนใจในการพัฒนาและต่อยอดงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาบทปฏิบัติการอีกด้วย

GRAD VRU

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก โดยแบ่งออกเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

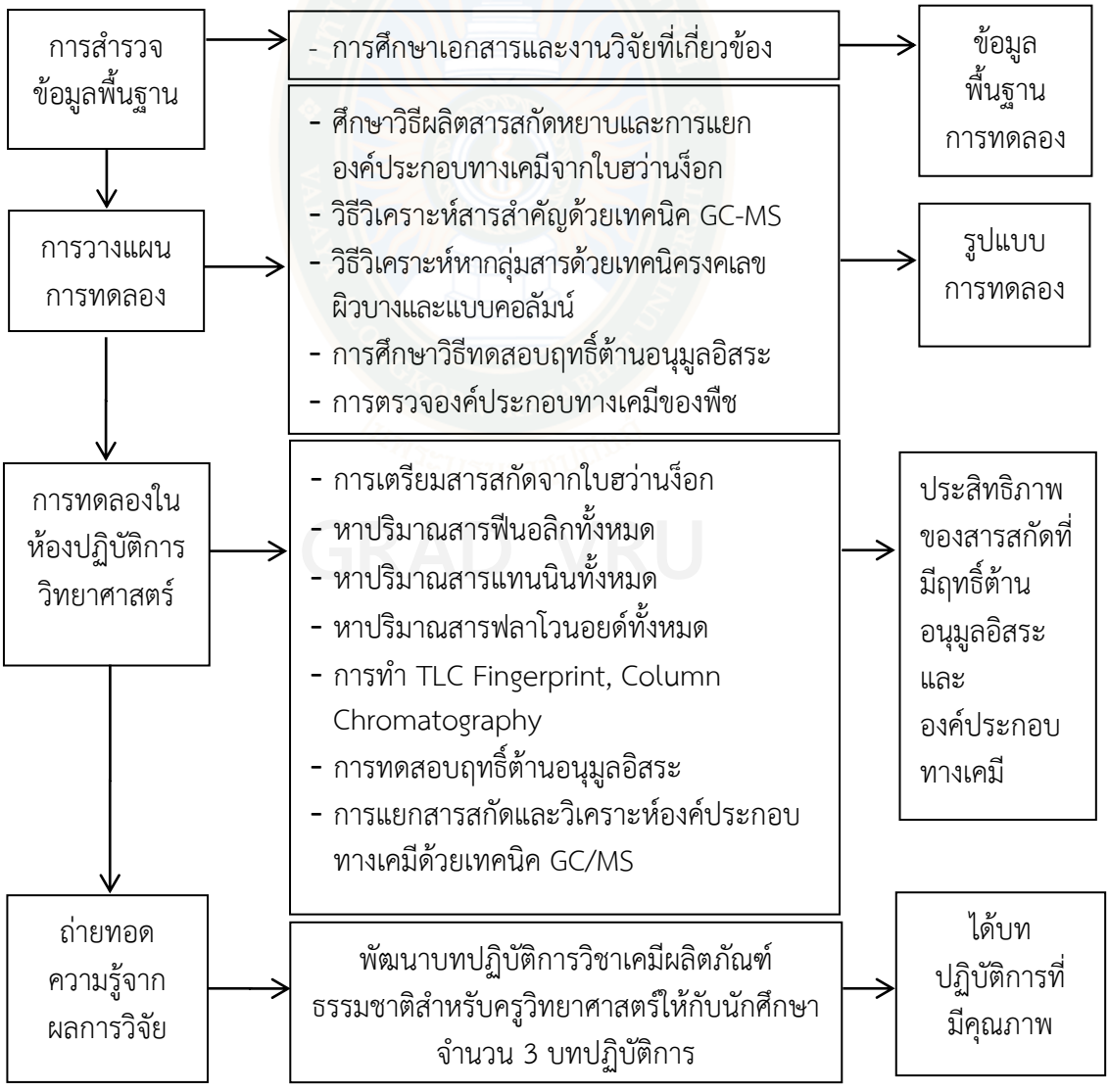
3.1 การสำรวจข้อมูลพื้นฐาน

3.2 การวางแผนการทดลอง

3.3 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

3.4 ถ่ายทอดความรู้จากผลการวิจัยโดยการพัฒนาบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์

ในแต่ละขั้นตอนมีกิจกรรมย่อย ซึ่งแสดงเป็นแผนภูมิดังภาพที่ 3.1 ได้ดังนี้



ภาพที่ 3.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.1 การสำรวจข้อมูลพื้นฐาน

ขั้นตอนนี้เป็นการสำรวจข้อมูลพื้นฐาน ทำการสำรวจข้อมูลที่เกี่ยวกับการทำวิจัย ได้แก่ เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรฮว่านง็อก ข้อมูลทั่วไปของฮว่านง็อก การสกัดสารสำคัญจากพืช การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพืช การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

3.2 การวางแผนการทดลอง

ทำการวางแผนการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบพืชและนำมาสกัดสารสำคัญ การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี การแยกองค์ประกอบทางเคมี การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืชที่ทำการวิจัย

3.3 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องยูวี วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometer)
2) เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance)
3) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
4) เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)
5) ตู้อบชนิดลมร้อน (Hot Air Oven)
6) ตู้แช่สารอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Deep Freezer)
7) เครื่องส่องรังสีเหนือม่วง (Ultraviolet Light)
8) เครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dryer)
9) เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Vacuum Rotary Evaporator)
10) คอลัมน์โครมาโทกราฟี (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซ.ม)
11) กระดาษกรองเบอร์ 41
12) เครื่องแก้วพื้นฐาน

3.3.2 สารเคมี

1) 95 % เอทานอล (C_2H_5OH ; Commercial Grade, Merck, Germany)
2) 99.9 % เอทานอล (C_2H_5OH ; AR Grade, Merck, Germany)
3) เมทานอล (CH_3OH ; AR Grade, Merck, Germany)
4) เมทิลีนคลอไรด์ (CH_2Cl_2 ; AR Grade, Merck, Germany)
5) เฮกเซน (C_6H_{14} ; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)
6) เอทิลอะซีเตท ($C_4H_8O_2$; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)
7) อะซีโตน (C_3H_6O ; Commercial Grade, Merck, Germany)
8) คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$; Commercial Grade, Merck, Germany)
9) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 ; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)

10) กรดฟอร์มิก (CH_2O_2 ; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)

11) กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)

12) กรดแทนนิก ($C_{76}H_{52}O_{46}$; Sigma, USA)

13) กรดแกลลิก ($C_7H_6O_5$; Sigma, USA)

14) รูทิน ($C_{27}H_{30}O_{16}$; Sigma, USA)

15) เบต้า-ซิโตสเตอรอล ($C_{29}H_{50}O$; Sigma, USA)

16) ดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Reagent ; Sigma, USA)

17) เนเจอรัลโปรดักส์ (NP, Natural Products ; Sigma, USA)

18) โพลีเอธิลลีนไกลคอล (PEG, Polyethylene Glycol ; Sigma, USA)

19) ฟอร์ลิน (Folin Ciocalteu Reagent ; Sigma, USA)

20) ควินินซัลเฟต (Quinine Sulfate ; Sigma, USA)

21) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 ; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)

22) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4 ; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)

23) โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$; Commercial Grade, Merck, Germany)

24) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4 ; Commercial Grade, Fluka, Switzerland)

25) อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$; AR Grade, Sigma, USA)

26) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH ; Commercial Grade, Fluka, Germany)

27) น้ำกลั่น (H_2O)

28) ซิลิก้าเจลสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silicagel No.7734, Merk, Germany)

29) แผ่นทำ TLC Aluminium Silica gel 60 F 254 (Layer Thickness 0.25 mm , Merck, Germany)

3.3.3 การเตรียมสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกโดยวิธีการแช่ยุ่ย (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

3.3.3.1 ทำการล้างใบฮว่านง็อกให้สะอาด นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศา-เซลเซียส จนกระทั่งใบฮว่านง็อกแห้ง นำมาบดให้ละเอียด

3.3.3.2 นำใบฮว่านง็อกที่ผ่านการอบและบดมา 2,000 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง แช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4,000 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ปิดฝาเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน

3.3.3.3 นำสารจากข้อ 3.3.3.2 มากรองเอากากออก สกัดซ้ำด้วยเอทานอล ทิ้งไว้ 5 วัน แล้วนำส่วนสารสกัดที่ได้เก็บไว้ในขวดเพื่อทำการระเหยตัวทำละลายออก

3.3.3.4 รวบรวมสารสกัดใบฮว่านง็อกที่ได้ไปกรอง นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน หากระเหยเอทานอลออกไม่หมด ให้นำไประเหยแห้งแบบ

GRAD VRU

เยือกแข็ง จะได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ แล้วบันทึกผลคำนวณหาร้อยละผลิตผล (% Yield) ของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

$$\text{ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก}}{\text{น้ำหนักใบฮว่านง็อกอบแห้ง}} \times 100$$

เก็บสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกที่ได้ แช่ตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสาระสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิคยูวีวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี (Leite, & Dourado, 2013: Lingkard, & Singlaton, 1977)

3.3.4.1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของใบฮว่านง็อก

1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 10 มิลลิกรัมที่ละลายด้วยเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาละลายด้วยเอทานอล 99.90 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.90 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 99.90 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (1.0, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง Na_2CO_3 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4) วิธีการทดลอง ปิเปตน้ำกลั่น 8,400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ปิเปตสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมฟอร์ลิน 500 ไมโครลิตร เขย่า 1 นาที เติม สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

5) การเตรียม Blank ปิเปตน้ำกลั่น 8,500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมฟอร์ลิน 500 ไมโครลิตร เขย่า 1 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.3.4.2 การหาปริมาณแทนนินทั้งหมดของใบฮว่านง็อก

1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ชั่งสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 10 มิลลิกรัม ที่ละลายด้วยเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาละลายด้วยเอทานอล 99.90 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ชั่งสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.90 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย

เอทานอล 99.90 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (1.0, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง Na_2CO_3 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4) วิธีการทดลอง ปิเปตน้ำกลั่น 8,400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ปิเปตสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมฟอร์ลิน 500 ไมโครลิตร เขย่า 1 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

5) การเตรียม Blank ปิเปตน้ำกลั่น 8,500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมฟอร์ลิน 500 ไมโครลิตร เขย่า 1 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.3.4.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของใบฮว่านง็อก

1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ชั่งสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 10 มิลลิกรัม ที่ละลายด้วยเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาละลายด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ชั่งสารละลายมาตรฐานรูทิน 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (1.0, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3) การเตรียมโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง $NaNO_2$ 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4) การเตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง $AlCl_3$ 10 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5) การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ โดยชั่ง NaOH 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร

6) การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปิเปตสารตัวอย่าง/สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ที่เวลา 0 นาที เติมโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

7) การเตรียม Blank ปิเปตน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 นาที เติมโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.3.5 การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อกด้วยเทคนิค TLC fingerprints (ศศมล ผาสุข และประเสริฐ มีรัตน์ 2557; Bolliger, et al. 1965; Merck 1980; Wanger & Bladt 1996)

3.3.5.1 การทำ TLC Fingerprints เพื่อหาสารสเตียรอยด์-เทอร์ปีนส์

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ชั่งเบต้า-ซิโตสเตอรอล 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในคลอโรฟอร์ม

2) การเตรียมน้ำยาวานิลลิน-กรดซัลฟูริก ละลายวานิลลิน 3 กรัม ในสารละลายที่มี Absolute เอทานอล 100 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริก 0.5 มิลลิลิตร

3) การวิเคราะห์หาสารกลุ่มสเตียรอยด์-เทอร์ปีนส์ ชั่งผงใบฮ่วนง็อก 5 กรัม เติมเฮกเซน 25 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 ชะล้างกระดาษกรองด้วยเฮกเซน 5 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไประเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40–50 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Spot บนแผ่น TLC แล้วใส่ลงในถังทำ TLC ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ตั้งทิ้งให้วัฏภาคเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC พ่นด้วยน้ำยาวานิลลิน-กรดซัลฟูริก ตรวจดูแถบสารภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.3.5.2 การทำ TLC Fingerprints เพื่อหาสารแอลคาลอยด์

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟต ชั่งควินินซัลเฟต 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล

2) การเตรียมน้ำยาดราเจนดอร์ฟ สารละลาย A: ละลายบิสมัธ (III) ไนเตรต 0.85 กรัม ในสารละลายที่มีกรดอะซิติก 99.70 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร และน้ำ 40 มิลลิลิตร สารละลาย B: ละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์ 8 กรัม ด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร Stock Solution: ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วนที่เท่ากัน วิธีใช้ ผสม Stock Solution 1 มิลลิลิตร กับกรดอะซิติก 99.70 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร และน้ำ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดพ่นบนแผ่น TLC

3) การวิเคราะห์หาสารกลุ่มแอลคาลอยด์ ชั่งผงใบฮ่วนง็อก 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร เขย่า 20 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 ชะล้างกระดาษกรองด้วยกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ทำให้เป็นด่างโดยเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ จนได้ค่า pH 8–9 สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (3 ครั้ง 40 มิลลิลิตร ครั้งละ 10 นาที) ในกรวยแยก รวมสารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์มมากำจัดน้ำที่ปนอยู่โดยกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสบนกระดาษกรองเบอร์ 41 แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40–50 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Spot บนแผ่น TLC แล้วใส่ลงในถังทำ TLC ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ ตั้งทิ้งให้วัฏภาคเคลื่อนที่ซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC พ่นด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ ตรวจดูแถบสารภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.3.5.3 การทำ TLC Fingerprints เพื่อหาสารฟลาโวนอยด์

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานรูทิน ชั่งรูทิน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล

2) การเตรียมน้ำยาเนเจอรัลโปรดักส์-โพลีเอธิลลีนไกลคอล สารละลาย A: ละลายไดฟินิลโบริลออกซีเอธิลเอมีน 1 กรัม ด้วยเมธานอล 100 มิลลิลิตร สารละลาย B: ละลายโพลีเอธิลีนไกลคอล ปริมาณ 5 กรัม ด้วยเอทานอล 100 มิลลิลิตร วิธีใช้ ฉีดพ่นสารละลาย A แล้วตามด้วยสารละลาย B

3) การวิเคราะห์หาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ชั่งผงใบฮว่านง็อก 10 กรัม เติมเมทานอล 40 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทิ้งให้เย็น กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 ชะล้างกระดาษกรองด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไประเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40–50 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Spot บนแผ่น TLC แล้วใส่ลงในถังทำ TLC ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ ตั้งทิ้งให้วัฏภาคเคลื่อนที่ ซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ตรวจดูแถบสารภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.3.6 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิคคอลัมน์-โครมาโทกราฟีและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิค GC-MS (ศศมล ผาสุข และประเสริฐ มีรัตน์ 2555; Chanakul, Kukusamude, Chanthai & Ruangviriyachai, 2006)

3.3.6.1 นำสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกที่ได้ จากข้อ 3.3.3 มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชั่งสารสกัดหยาบมา 40 กรัม ผสมกับซิลิก้าเจล 80 กรัม ทำให้แห้ง บรรจุลงคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 x 60 เซนติเมตร ที่บรรจุซิลิก้าเจล

3.3.6.2 ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน, เฮกเซน : เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตท, เอทิลอะซีเตท : เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ โดยค่อย ๆ เพิ่มสภาวะขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลายในการชะครั้งละ 200 มิลลิลิตร

3.3.6.3 ทำการเก็บแต่ละส่วนย่อย (Fraction) และตรวจสอบองค์ประกอบของสารแต่ละส่วนด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ TLC Aluminium Silica Gel 60 F_{254} (Merck, Layer Thickness 0.25 mm) ทำการรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน โดยวิเคราะห์หาอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ขององค์ประกอบของสารตัวอย่าง การคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อน (R_f) ที่ได้ ดังนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อน } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

บันทึกผลการทดลองและเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบของสารในตัวอย่างแต่ละชนิด รวมส่วนย่อยที่คล้ายกันเข้าด้วยกัน

3.3.6.4 นำส่วนย่อยที่รวมได้ไปศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แล้วนำส่วนย่อยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

3.3.7 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay (Lo, & Cheung, 2005)

3.3.7.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1) ชั่งสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 0.010 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อช่วยการละลาย

2) นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.3.7.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) ชั่งสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) 0.010 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อช่วยการละลาย

2) นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.3.7.3 การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH

ชั่ง DPPH 0.0237 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้ Stock Solution เข้มข้น 6×10^{-3} โมลาร์ เมื่อจะนำมาใช้ให้เจือจางให้เป็น 6×10^{-5} โมลาร์ โดยปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.7.4 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ BHA โดยผสมสารละลายลงในหลอดทดลองตามตารางที่ 3.1 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

Reagents	Control (มิลลิลิตร)	Blank (มิลลิลิตร)	Sample (มิลลิลิตร)	Standard 1 (มิลลิลิตร)	Standard 2 (มิลลิลิตร)
สารสกัดสมุนไพร	-	1	1		
สารมาตรฐาน BHT	-			1	
สารมาตรฐาน BHA	-				1
99.99 % เอทานอล	1	1			
สารละลาย DPPH	1		1	1	1
ผสมสารทดสอบในแต่ละหลอดให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีในที่มืด จากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร					

ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารจะแสดงค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH Scavenging) ดังสมการ

$$\%\ DPPH\ scavenging = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} x\,100$$

$Abs_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย DPPH
Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารทดสอบ

ในการรายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ จะรายงานด้วยค่า EC_{50} ซึ่งได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับการตอบสนองที่เกิดขึ้นในรูปของ % DPPH Scavenging ซึ่งในการคำนวณหาค่า EC_{50} ของงานวิจัยนี้ใช้ Semilog Scale คือ แทนค่าแกน x ด้วยค่า Log ความเข้มข้น และคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม Graphpad Prism Version 6.01 โดยค่า EC_{50} คือความเข้มข้นที่มีค่า % DPPH Scavenging เท่ากับ 50

3.4 ถ่ายทอดความรู้จากผลการวิจัยโดยการพัฒนาบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์

หลังจากทำการทดลองในห้องปฏิบัติการแล้วและได้ผลการทดลอง ผู้วิจัยได้นำผลการวิจัยมาเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการพัฒนาบทปฏิบัติการรายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์ให้กับนักศึกษา เป็นจำนวน 3 บทปฏิบัติการ ซึ่งในแต่ละบทปฏิบัติการประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ (Leite, & Dourado, 2013) ดังนี้

1) ชื่อบทปฏิบัติการ
2) เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ
3) หลักการ/ทฤษฎี
4) วัตถุประสงค์
5) อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมี
6) วิธีการทดลอง
7) รายงานผลการทดลอง
8) คำถามท้ายการทดลอง

3.4.1 ขั้นตอนการสร้างบทปฏิบัติการ ดังนี้

3.4.1.1 ศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วย รายละเอียดของวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์ โดยพิจารณามุ่งเน้นขอบเขตและรายละเอียดของเนื้อหา วิชา รวมทั้งเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิครงคเลขผิวบางและเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3.4.1.2 วิเคราะห์คำอธิบายรายวิชา เนื้อหา ขอบข่าย และรายละเอียดวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์เพื่อกำหนดบทเรียนที่จะสร้างบทปฏิบัติการ

3.4.1.3 กำหนดจุดประสงค์ของบทปฏิบัติการแต่ละบท

3.4.1.4 พัฒนาบทปฏิบัติการ 3 บทปฏิบัติการ ใช้เวลาสอนบทปฏิบัติการละ 4 คาบ ดังนี้

1) บทปฏิบัติการที่ 1 เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

2) บทปฏิบัติการที่ 2 เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮว่านง็อกด้วยอัลตราไวโอเลต วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3) บทปฏิบัติการที่ 3 เรื่อง การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮว่านง็อกด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

3.4.1.5 การหาคุณภาพบทปฏิบัติการ นำทั้ง 3 บทปฏิบัติการ ไปหาคุณภาพของบทปฏิบัติการ ดังนี้

1) การหาดัชนีความสอดคล้อง ผู้วิจัยนำบทปฏิบัติการทั้ง 3 บท เสนอประธานและกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ เพื่อขอคำแนะนำแก้ไขแล้วจึงนำไปให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาความสอดคล้องเกี่ยวกับเนื้อหา หลักการ/ทฤษฎี วัตถุประสงค์ อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมี วิธีการทดลอง รายงานผลการทดลอง คำถามท้ายการทดลอง โดยประเมิน 3 ส่วน ได้แก่ เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ บทปฏิบัติการ รายงานผลการทดลองและคำถามท้ายการทดลอง

2) ผู้วิจัยนำผลการประเมินบทปฏิบัติการของผู้ทรงคุณวุฒิ มาปรับปรุงแก้ไขตามคำแนะนำ โดยบทปฏิบัติการที่มีคุณภาพต้องมีค่าดัชนีความสอดคล้องสูงกว่า 0.5

3.4.1.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

1) ค่าเฉลี่ย (Mean; $\bar{X}$) คำนวณได้จากสูตร (พวงรัตน์ ทวีรัตน์, 2538)

$$\overline{X} = \sum_{i=1}^{N} \frac{X_i}{N}$$

เมื่อ $\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ย

X_i คือ ค่าที่ได้จากการทดลองในแต่ละครั้ง

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

2) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; S.D.) คำนวณได้จากสูตร (พวงรัตน์ ทวีรัตน์, 2538)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(Xi - \overline{X})^2}{N-1}}$$

เมื่อ $\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ย

S.D. คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

X_i คือ ค่าที่ได้จากการทดลอง

N คือ จำนวนข้อมูล

3) ดัชนีความสอดคล้อง เป็นการหาความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับเนื้อหา ของเอกสารประกอบบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับวิธีการทดลองของบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับคำถามท้ายการทดลองของรายงานผลและคำถามท้ายการทดลองแต่ละบทที่สร้างขึ้น (พวงรัตน์ ทวีรัตน์, 2538)

$$IOC = \frac{\sum R}{N}$$

เมื่อ IOC คือ ดัชนีความสอดคล้องระหว่างข้อคำถามกับเนื้อหา

$\sum R$ คือ ผลรวมของคะแนนความคิดของผู้เชี่ยวชาญทั้งหมด

N คือ จำนวนผู้เชี่ยวชาญทั้งหมด

GRAD VRU

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยเรื่อง ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ดำเนินการทดลองตามลำดับขั้นตอนและได้ผลการทดลอง ดังนี้

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในใบฮว่านง็อก

4.2 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

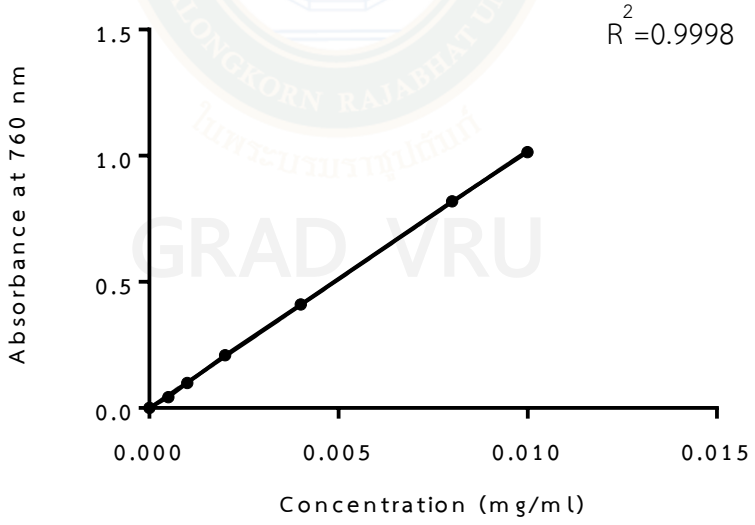
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

4.5 ผลการพัฒนาบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์รายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในใบฮว่านง็อก

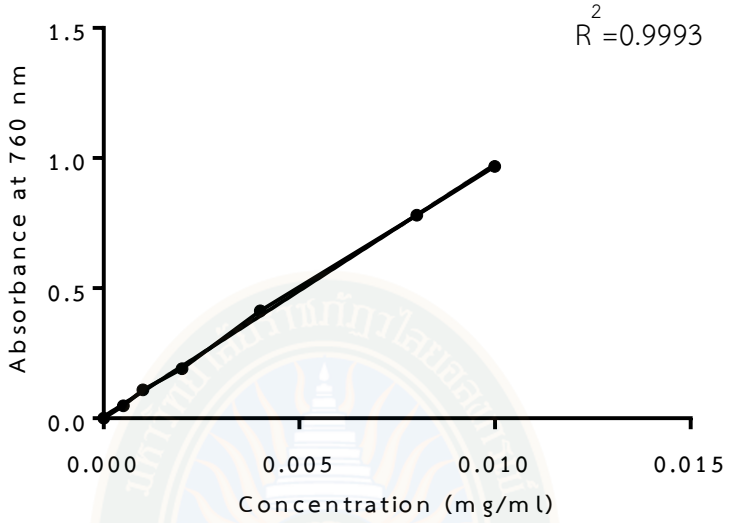
4.1.1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1.80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

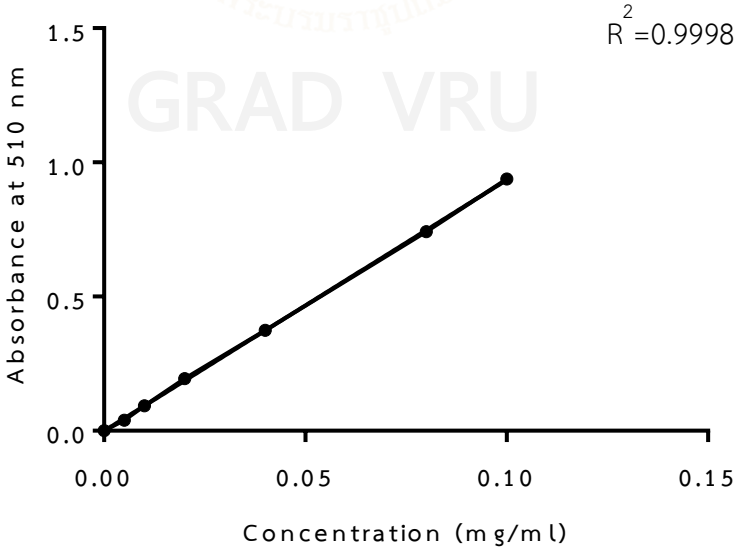
4.1.2 การหาปริมาณแทนนินทั้งหมด



ภาพที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก

สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณแทนนินทั้งหมดเท่ากับ 1.85 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก

4.1.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

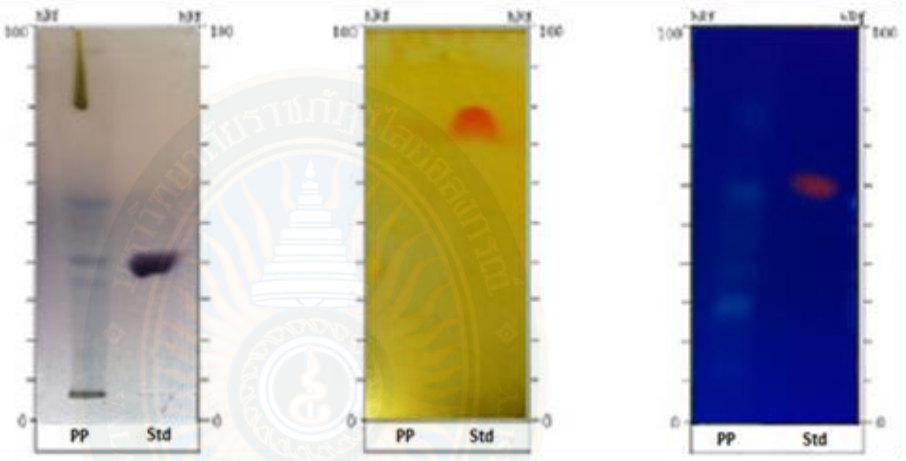


ภาพที่ 4.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานรูทิน

สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 40.52 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานรูทิน

4.1.4 การวิเคราะห์ชนิดของกลุ่มสารสำคัญ

การทำ TLC Fingerprint เพื่อหาชนิดกลุ่มสารสำคัญของของใบฮว่านง็อก กลุ่มสารสำคัญที่ทดสอบในครั้งนี้ประกอบด้วย สเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ แอลคาลอยด์ และฟลาโวนอยด์ ผลการทดสอบเทียบกับสารมาตรฐาน แสดงดังภาพที่ 4.4



(1) (2) (3)

ภาพที่ 4.4 TLC Fingerprints ของกลุ่มสารสำคัญในใบฮว่านง็อก: PP (1), PP (2) และ PP (3) คือสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก Std. (1) คือสารกลุ่มเสตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ Std. (2) คือสารกลุ่มแอลคาลอยด์ และ Std. (3) คือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

4.1.4.1 สเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์

สารกลุ่มเสตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ เฮกเซน-เอทิลอะซิเตต อัตราส่วน 10:2 สารมาตรฐานที่ใช้ คือ เบต้า-ซิโตสเตอรอล (ß-Sitosterol) น้ำยาพ่นที่ใช้ทดสอบ คือ วานิลลีน (Vanillin) ผลการทดสอบการตรวจหาสารกลุ่มเสตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ สารตัวอย่างใบฮว่านง็อกสามารถดูดซับและแยกกันได้ดีในสภาวะนี้ สามารถแยกได้ถึง 7 จุด มีค่า R_f เท่ากับ 0.110, 0.205, 0.390, 0.475, 0.550, 0.600 และ 0.810 มีสารละลายตัวอย่างหนึ่งกลุ่มที่มีค่า R_f เท่ากับสารละลายมาตรฐาน R_f เท่ากับ 0.475

4.1.4.2 แอลคาลอยด์

สารกลุ่มแอลคาลอยด์ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 30:7:1 สารมาตรฐานที่ใช้ คือ ควินีนซัลเฟต (Quinine Sulphate) น้ำยาพ่นที่ใช้ทดสอบ คือ ดราเจนดอร์ฟ ผลการทดสอบ การตรวจหาสารกลุ่มแอลคาลอยด์ พบว่า สารละลายมาตรฐานสามารถดูดซับได้ดีในสภาวะนี้ มีค่า R_f เท่ากับ 0.805 แต่ไม่พบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ ในสารตัวอย่างใบฮว่านง็อก

4.1.4.3 ฟลาโวนอยด์

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ เอทิลอะซิเตต - กรดฟอร์มิก- กรดอะซิติก-น้ำ อัตราส่วน 10:1:1:2 สารมาตรฐานที่ใช้ คือ รูทิน (Rutin) น้ำยาพ่นที่ใช้ทดสอบ คือ น้ำยาเนเจอรัล โปรดักส์-โพลีเอธิลลีนไกลคอล ผลการทดสอบ การตรวจหาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่า สารตัวอย่างใบฮว่านง็อก ดูดซับและแยกกันได้ดีในสภาวะนี้ สามารถแยกได้ถึง 6 จุด มีค่า R_f เท่ากับ 0.110, 0.320, 0.390, 0.490, 0.610 และ 0.810 มีสารละลายตัวอย่างหนึ่งกลุ่มที่มีค่า R_f เท่ากับสารละลายมาตรฐาน R_f เท่ากับ 0.610

4.2 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ เฮกเซน:เอทิลอะซีเตต ในอัตราส่วน 2:10 จึงนำระบบดังกล่าวมาแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทำการเก็บส่วนย่อย (Fraction) ที่ออกมาจากคอลัมน์ได้ทั้งหมด 169 ส่วนย่อย โดยเก็บครั้งละ 200 มิลลิลิตร ทำการรวมส่วนย่อยที่มีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากันด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง ได้สารสกัด 7 กลุ่ม ดังตารางที่ 4.1

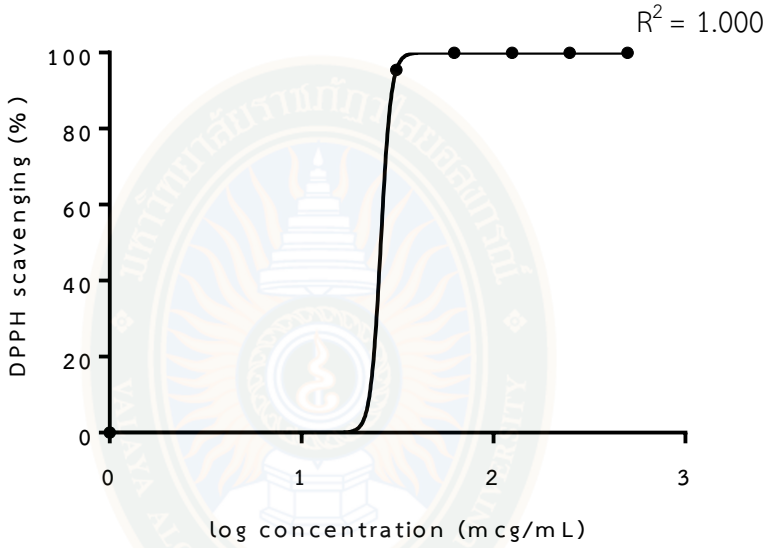
ตารางที่ 4.1 ผลการรวมส่วนย่อยที่ได้จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

กลุ่มที่	ส่วนย่อยที่รวม	น้ำหนักสารที่ได้ (กรัม)
1	Ft_1 ถึง Ft_{24}	0.071
2	Ft_{25} ถึง Ft_{33}	0.045
3	Ft_{34} ถึง Ft_{59}	0.027
4	Ft_{60} ถึง Ft_{129}	0.036
5	Ft_{130} ถึง Ft_{145}	0.077
6	Ft_{146} ถึง Ft_{154}	0.686
7	Ft_{155} ถึง Ft_{169}	6.451

จากตารางที่ 4.1 พบว่าสามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม จาก 169 ส่วนย่อย จึงได้นำสารสกัดทั้ง 7 กลุ่มไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

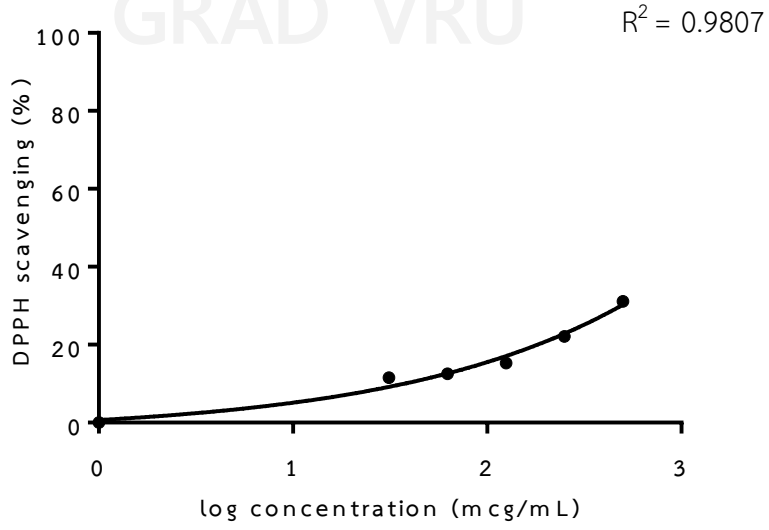
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้ ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay แสดงดังกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับการตอบสนองที่เกิดขึ้นในรูปของ % DPPH Scavenging ภาพที่ 4.5-4.14 และตารางที่ 4.2

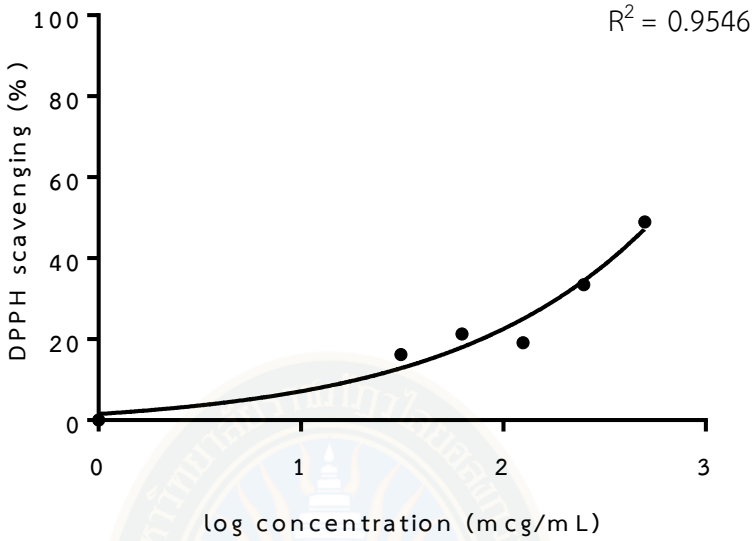


ภาพที่ 4.5 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

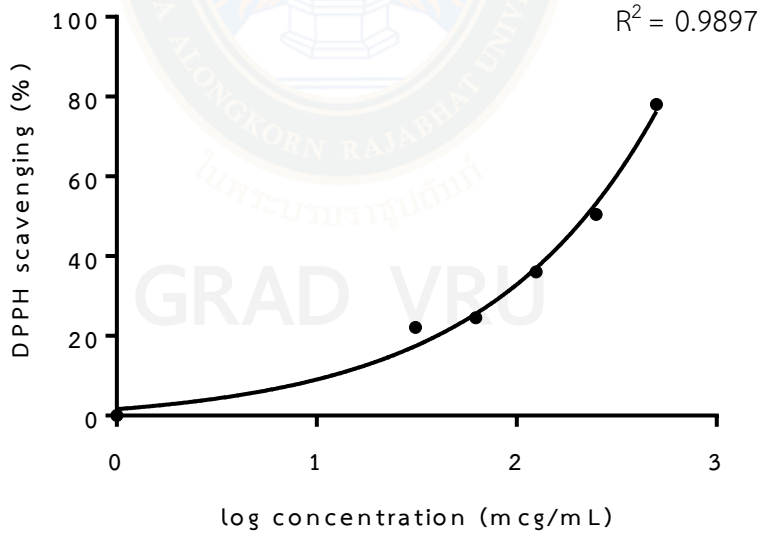
GRAD VRU



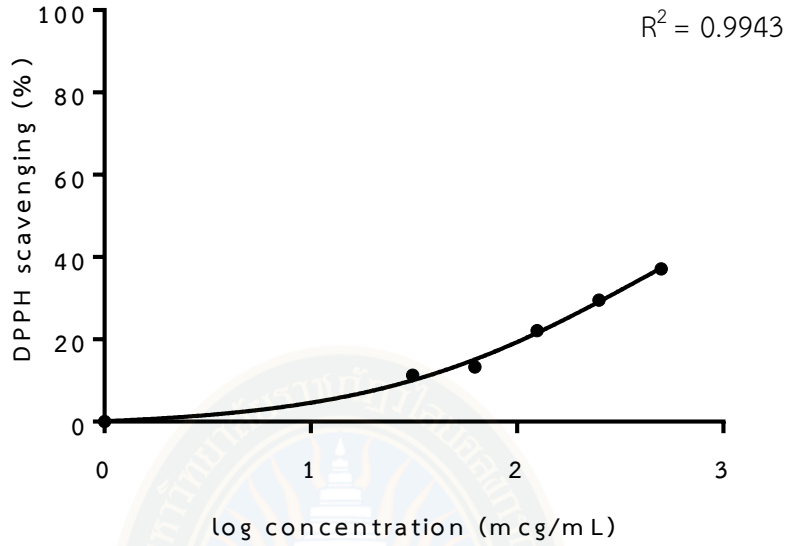
ภาพที่ 4.6 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 1



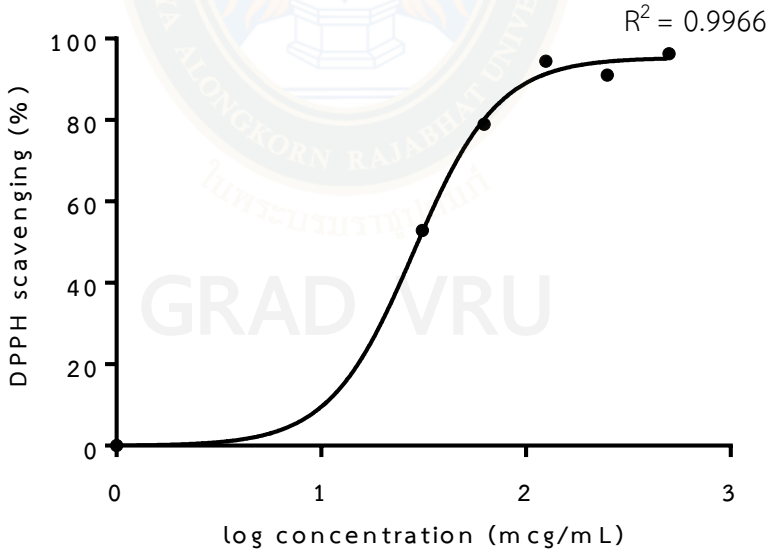
ภาพที่ 4.7 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 2



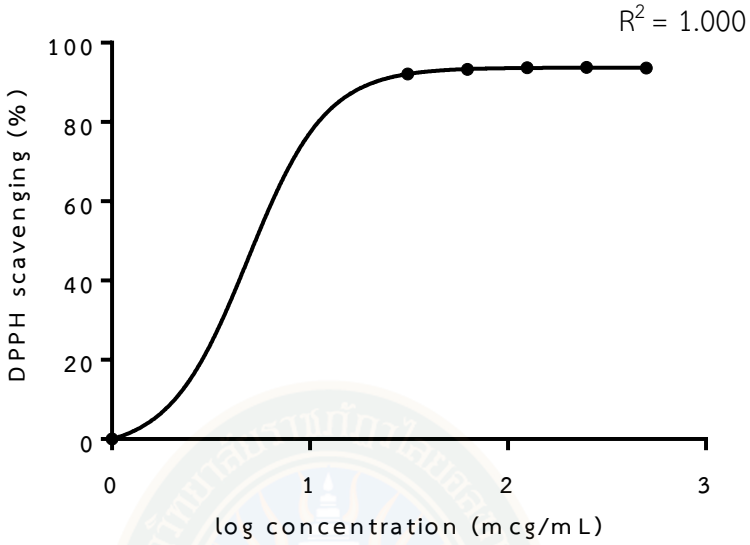
ภาพที่ 4.8 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 3



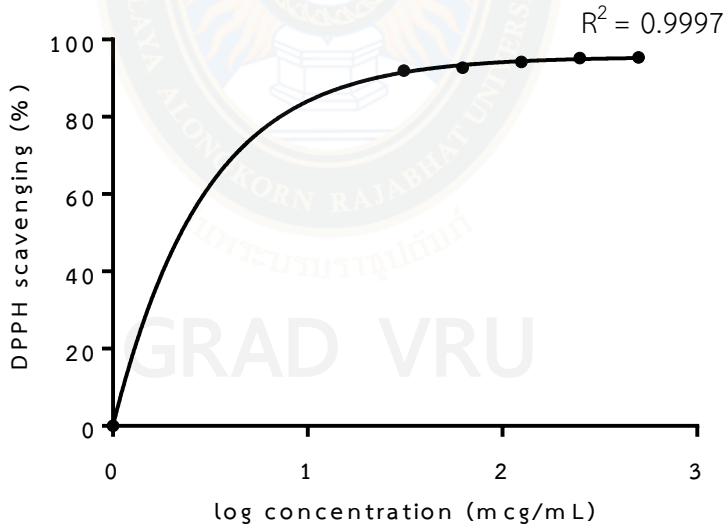
ภาพที่ 4.9 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 4



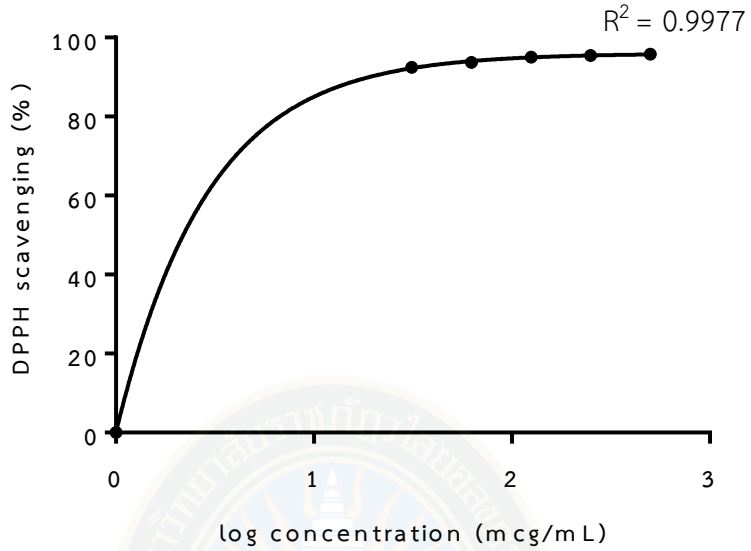
ภาพที่ 4.10 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 5



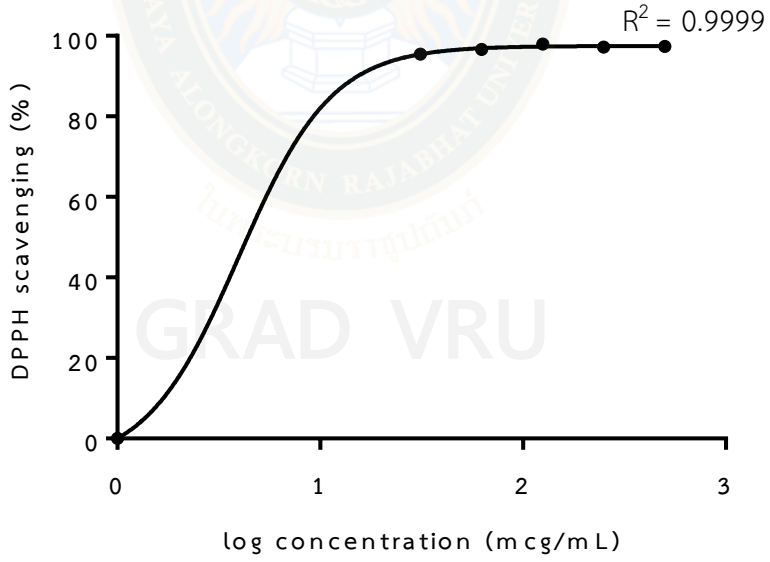
ภาพที่ 4.11 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 6



ภาพที่ 4.12 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้กลุ่มที่ 7



ภาพที่ 4.13 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน BHT



ภาพที่ 4.14 กราฟความเข้มข้นกับการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน BHA

GRAD VRU

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อกและสารที่แยกได้เทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	DPPH scavenging (%)	EC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัดหยาบ	31.25	95.48	0.031
	62.5	100.00	
	125	100.00	
	250	100.00	
	500	100.00	
กลุ่มที่ 1	31.25	11.57	0.329
	62.5	12.55	
	125	15.29	
	250	22.11	
	500	31.15	
กลุ่มที่ 2	31.25	16.23	0.254
	62.5	21.30	
	125	19.16	
	250	33.48	
	500	48.94	
กลุ่มที่ 3	31.25	22.14	1.597
	62.5	24.54	
	125	36.02	
	250	50.47	
	500	78.01	
กลุ่มที่ 4	31.25	11.29	0.177
	62.5	13.33	
	125	22.10	
	250	29.52	
	500	37.13	
กลุ่มที่ 5	31.25	52.84	0.061
	62.5	78.94	
	125	94.47	
	250	91.04	
	500	96.26	

GRAD VPU

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	DPPH scavenging effect (%)	EC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
กลุ่มที่ 6	31.25	92.13	0.059
	62.5	93.32	
	125	93.74	
	250	93.76	
	500	93.60	
กลุ่มที่ 7	31.25	91.93	0.095
	62.5	92.67	
	125	94.24	
	250	95.23	
	500	95.37	
BHT	31.25	92.43	0.063
	62.5	93.67	
	125	95.04	
	250	95.48	
	500	95.82	
BHA	31.25	95.48	0.062
	62.5	96.65	
	125	97.99	
	250	97.17	
	500	97.35	

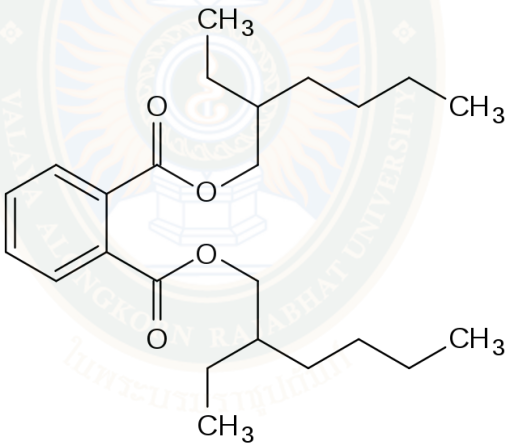
จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้ทั้ง 7 กลุ่ม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.031, 0.329, 0.254, 1.597, 0.177, 0.061, 0.059 และ 0.095 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.063 และ 0.062 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในกลุ่มสารที่แยกได้ทั้ง 7 กลุ่ม พบว่าสารสกัดกลุ่มที่ 6 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด จึงนำไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

จากการนำสารกลุ่มที่ 6 ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS ผลการทดสอบพบสาร Bis (2-ethylhexyl) Phthalate ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แสดงดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.15

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ			วิธีทดสอบอ้างอิง
	RT	% Area	% Match	
Bis (2-ethylhexyl) Phthalate	70.84	89.24	91	In-house Method based on GC-MS



ภาพที่ 4.15 สูตรโครงสร้างสาร Bis (2-ethylhexyl) Phthalate

4.5 ผลการพัฒนาบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์รายวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์

ผู้วิจัยนำผลการวิจัยมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นบทปฏิบัติการวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์จำนวน 3 บทปฏิบัติการ หาคุณภาพของบทปฏิบัติการโดยผ่านท่านผู้ทรงคุณวุฒิในการพิจารณาความสอดคล้องเกี่ยวกับเนื้อหาหลักการ/ทฤษฎี วัตถุประสงค์ อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมี วิธีการทดลอง รายงานผลการทดลอง คำถามท้ายการทดลอง โดยแบ่งเป็นหัวข้อ ดังนี้

GRAD VRU

4.5.1 บทปฏิบัติการที่ 1 เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

เมื่อพิจารณาความสอดคล้อง ระหว่างวัตถุประสงค์ กับเนื้อหาของเอกสารประกอบบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับวิการทดลองของบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับคำถามท้ายการทดลอง ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สรุปค่าดัชนีความสอดคล้องของบทปฏิบัติการ เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

รายการขอความคิดเห็น	**ความคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิที่**			**IOC**	**ความหมาย**	**หมายเหตุ**
	1	**2**	**3**			
ส่วนที่ 1 เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ						
1.1 ความถูกต้องของเนื้อหากับวัตถุประสงค์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
1.2 การเรียบเรียงเนื้อหากับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
ส่วนที่ 2 บทปฏิบัติการ						
2.1 วัตถุประสงค์กับชื่อเรื่อง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.2 หลักการ/ทฤษฎี กับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.3 วัตถุประสงค์กับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.4 วิธีการทดลองกับการส่งเสริมให้นักศึกษามีทักษะปฏิบัติการทดลอง	0	1	1	0.67	สอดคล้อง	
ส่วนที่ 3 รายงานผลการทดลอง						
3.1 รายงานผลการทดลองกับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
3.2 คำถามท้ายการทดลองกับการส่งเสริมการคิดวิเคราะห์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
3.3 คำถามท้ายการทดลองกับวัตถุประสงค์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
รวม				8.67		
เฉลี่ย				0.96	สอดคล้อง	

4.5.2 บทปฏิบัติการที่ 2 เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮ่วนง็อกด้วยอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เมื่อพิจารณาความสอดคล้อง ระหว่างวัตถุประสงค์ กับเนื้อหาของเอกสารประกอบบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับวิธารทดลองของบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับคำถามท้ายการทดลอง ได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 สรุปค่าดัชนีความสอดคล้องของบทปฏิบัติการ เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮว่านง็อกด้วยอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

รายการขอความคิดเห็น	ความคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิที่			IOC	ความหมาย	หมายเหตุ
	1	2	3			
ส่วนที่ 1 เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ						
1.1 ความถูกต้องของเนื้อหากับวัตถุประสงค์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
1.2 การเรียบเรียงเนื้อหากับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
ส่วนที่ 2 บทปฏิบัติการ						
2.1 วัตถุประสงค์กับชื่อเรื่อง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.2 หลักการ/ทฤษฎี กับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.3 วัตถุประสงค์กับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.4 วิธีการทดลองกับการส่งเสริมให้นักศึกษามีทักษะปฏิบัติการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
ส่วนที่ 3 รายงานผลการทดลอง						
3.1 รายงานผลการทดลองกับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
3.2 คำถามท้ายการทดลองกับการส่งเสริมการคิดวิเคราะห์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
3.3 คำถามท้ายการทดลองกับวัตถุประสงค์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
รวม				9.00		
เฉลี่ย				1.00	สอดคล้อง	

4.5.3 บทปฏิบัติการที่ 3 เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮว่านง็อกด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

เมื่อพิจารณาความสอดคล้อง ระหว่างวัตถุประสงค์ กับเนื้อหาของเอกสารประกอบบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับวิธารทดลองของบทปฏิบัติการ ความสอดคล้องระหว่างวัตถุประสงค์กับคำถามท้ายการทดลอง ได้ผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 สรุปค่าดัชนีความสอดคล้องของบทปฏิบัติการ เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮ่วนง็อกด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

รายการขอความคิดเห็น	**ความคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิที่**			**IOC**	**ความหมาย**	**หมายเหตุ**
	1	**2**	**3**			
ส่วนที่ 1 เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ						
1.1 ความถูกต้องของเนื้อหากับวัตถุประสงค์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
1.2 การเรียบเรียงเนื้อหากับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
ส่วนที่ 2 บทปฏิบัติการ						
2.1 วัตถุประสงค์กับชื่อเรื่อง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.2 หลักการ/ทฤษฎี กับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.3 วัตถุประสงค์กับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
2.4 วิธีการทดลองกับการส่งเสริมให้นักศึกษามีทักษะปฏิบัติการทดลอง	0	1	1	0.67	สอดคล้อง	
ส่วนที่ 3 รายงานผลการทดลอง						
3.1 รายงานผลการทดลองกับวิธีการทดลอง	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
3.2 คำถามท้ายการทดลองกับการส่งเสริมการคิดวิเคราะห์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
3.3 คำถามท้ายการทดลองกับวัตถุประสงค์	1	1	1	1.00	สอดคล้อง	
รวม				8.67		
เฉลี่ย				0.96	สอดคล้อง	

GRAD VRU

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยเรื่อง ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1.80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณแทนนินทั้งหมดเท่ากับ 1.85 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 40.52 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การวิเคราะห์ด้วย TLC Fingerprint พบว่า ใบฮว่านง็อกมีสารกลุ่มสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แต่ไม่พบสารกลุ่มแอลคาลอยด์

5.1.2 แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกด้วยเทคนิคคอลัมน์-โครมาโทกราฟีได้ทั้งหมด 169 ส่วนย่อย และรวมส่วนย่อยที่มีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากันด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง ได้สารสกัดทั้งหมด 7 กลุ่ม

5.1.3 สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.031 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารที่แยกได้ทั้ง 7 กลุ่ม มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง มีค่าEC_{50} เท่ากับ 0.329, 0.254, 1.597, 0.177, 0.061, 0.059 และ 0.095 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.063 และ 0.062 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่าในกลุ่มสารที่แยกได้ทั้ง 7 กลุ่ม สารกลุ่มที่ 6 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

5.1.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มที่ 6 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด พบสาร Bis (2-ethylhexyl) Phthalate

5.1.5 การพัฒนาบทปฏิบัติการรายวิชา “เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์” พบว่า บทปฏิบัติการที่ 1, 2 และ 3 มีค่าดัชนีความสอดคล้องเท่ากับ 0.96, 1 และ 0.96 ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การวิเคราะห์ด้วย TLC Finger Print พบว่าใบฮว่านง็อกมีสารกลุ่ม สเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน สอดคล้องกับ Phytochemical Screening ด้วยวิธี TLC Fingerprint ของสารสกัดส่วนใบฮว่านง็อกที่สกัดด้วยเอทานอล (Chayarop, et al., 2011) ที่พบองค์ประกอบของสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ เทอปีนส์ เช่นเดียวกัน การตรวจองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกของงานวิจัยนี้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง (40.52 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ ยังพบสารฟีนอลิกด้วย และเมื่อนำสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.031 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารที่แยกได้จากสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยเฉพาะสารกลุ่มที่ 6 ซึ่งมีค่า มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.059 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับ BHT และ BHA ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.063 และ 0.062 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ

การศึกษาวิจัยของ Chanudom, et al. (2014) พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด สัมพันธ์กับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีองค์ประกอบของฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ จะมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง เช่นเดียวกับ Nguyen และ Eun (2011) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพรเวียดนาม 6 ชนิด ซึ่งมีใบฮว่านง็อกด้วย พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกสูง จะมีฤทธิ์ Radical Scavenging หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ระวิวรรณ แกวอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพืชสมุนไพรที่พบทั่วไปในจังหวัดอุบลราชธานี 8 ชนิด มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและ เอทานอล ไดสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทและเอทานอลทั้งหมด 36 สารสกัด จากนั้นทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH Scavenging Assay พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไดสูงกว่าสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตท สวนการหาปริมาณสารฟนอลรวมของสารสกัดชั้นเอทานอล โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu พบว่าปริมาณสารฟนอลรวมเมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลรวมกับการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกมีค่า EC_{50} ต่ำกว่าสารที่แยกได้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้ง 7 กลุ่ม อาจเป็นเพราะในสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกมีกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเสริมฤทธิ์กันอยู่ ดังนั้นเมื่อแยกสารที่เสริมฤทธิ์กันออกจากกันจึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดหยาบ

บทปฏิบัติการรายวิชา “เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับครูวิทยาศาสตร์” ให้กับนักศึกษาทั้ง 3 บทที่พัฒนาขึ้น พบว่าบทปฏิบัติการที่ 1, 2 และ 3 มีค่าดัชนีความสอดคล้องเท่ากับ 0.96 1 และ 0.96 ตามลำดับ ซึ่งผ่านการตรวจสอบโดยท่านผู้ทรงคุณวุฒิ แสดงว่าเป็นบทปฏิบัติการที่มีคุณภาพสามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกและสารที่แยกได้พบว่า สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด จึงควรนำสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อกไปใช้ในการศึกษาและพัฒนาต่อยอดงานวิจัยต่อไป

5.3.2 การศึกษาสารองค์ประกอบในใบฮว่านง็อกพบว่า มีกลุ่มสารออกฤทธิ์หลายกลุ่มที่น่าจะมีคุณสมบัติที่จะนำไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ ได้อีกหลายด้าน ควรสกัดแยกสารสำคัญในใบฮว่านง็อกเพื่อมาศึกษาฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ ต่อไป

5.3.3 เพื่อให้การศึกษาฤทธิ์ชีวภาพมีประสิทธิภาพมากขึ้น ควรนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำการสกัดเพิ่มเติม เพื่อกำจัดสารปนเปื้อนที่อาจไปบดบังฤทธิ์บางอย่างของสารสกัด ซึ่งอาจทำให้ค้นพบฤทธิ์ใหม่ ๆ ของสารสกัดได้

บรรณานุกรม

แฉล้ม มาศวรรณา, ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, เพียงเพ็ญ ศรวัต, และสุวัชชัย มิสุนา. (2554). ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในชากระเจี๊ยบแดง. **รายงานผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ปี 2555.** สืบค้นจาก http://www.kkfcrc.org.

ชลดา จัดประกอบ, พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ, และเมธิน ผดุงกิจ. (2556, กุมภาพันธ์). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ ของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้า. **ใน การประชุมทางวิชาการงานวิจัยเภสัชกรรมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครั้งที่ 5.** ขอนแก่น: คณะเภสัช-ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทัศนีย์ วัฒนชัยยงค์, และสวรักษ์ จันทรเทพธิมากุล. (2555). การประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์พร้อมดื่มจากกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น. **ว. วิทยาศาสตร์เกษตร.** 43(2), 661-664.

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคนอื่น ๆ. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง. **ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ.** 6(3), 195-201.

เบญจพร ศรีสุวรมาศ และคนอื่น ๆ. (2552). **การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสมุนไพรพญาวานรโดยการมีส่วนร่วมของผู้ใช้สมุนไพร.** รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

พวงรัตน์ ทวีรัตน์. (2538). **วิธีการวิจัยทางพฤติกรรมศาสตร์และสังคมศาสตร์.** พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

ระวิวรรณ แกวอมตวงศ, และทรงพร จึงมั่นคง. (2549). ฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. **วารสารวิชาการ ม.อบ.** 8(2), 76-88.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศศมล ผาสุข, และประเสริฐ มีรัตน์. (2555). **ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพิษกึ่งเฉียบพลันและพิษเฉียบพลันของสารสกัดแป๊ะตำปึงที่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน**. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี.

ศศมล ผาสุข, และประเสริฐ มีรัตน์. (2557). ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของสารสกัดหยาบฮว่านง็อก. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 22(6), 848-860.

หวานใจ โบบทอง. (2556). **การพัฒนาบทปฏิบัติการเคมี เรื่องจลนศาสตร์เคมี สำหรับนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5.** รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ กลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ โรงเรียนจุฬาภรณ์ราชวิทยาลัย ชลบุรี (โรงเรียนวิทยาศาสตร์ภูมิภาค).

สมหมาย ปะติตังโข (2553). การต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดพญาวานร. **วารสาร มฉก.วิชาการ.** 14(27), 123-136.

Alia, M., et. al. (2003). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. **Nutrition Research**. 23, 1251-1267.

Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**. 89(1), 27-36.

Bolliger, H. R., et al. (1965). **Thin-layer Chromategraph A Laboratory Hanbook**. New York: Academic Press.

Calis, S., & Simsekli, Y. (2012). A research on the retention of the experiments done in science and technology course for primary school students. **Procedia-Social and Behavioral Sciences**. 47, 717–721.

Chanakul, N., Kukusamude, C., Chanthai, S., & Ruangviriyachai, C. (2006). **Amino acids analysis of *Pseudomonas putida siderophore* by gas chromatography-mass spectrometry.** Poster presented at the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Oct. 10-12, Thailand.

Chanudom, L., Bhoopong,P., Khwanchuea, R., & Tangpong, J. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous & ethanol crude extracts of 13 Thai traditional plants. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.** 3(1), 549-558.

Chattopadhyay, K., & Chattopadhyay, B. D. (2008). Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. **Journal of research and education in Indian medicine**. 127, 571-576.

Chayarop, K., Peungvicha, P., Wongkrajang, Y., Chuakul, W., Amnuoypol, S., & Temsiririrkkul, R. (2011). Pharmacognostic and phytochemical investigations of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. ex Lindau Leaves. **Pharmacognosy Journal.** 3(23), 18-23.

Giang, P. M., Bao, H. V., & Son, P. T. (2003). Phytochemical study on *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., Acanthaceae. **Journal of Chemistry**. 41(2), 115-118.

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine.** 46, 531-542.

Lai, A. K., et al. (2007). Colour in relation to total antioxidant capacity of beers assessed using the FRAP assay. **Alcohol and Alcoholism**. 42(Suppl 1), i55-i57.

Leite, L., & Dourado, L. (2013). Laboratory activities, science education and problem-solving skills. **Procedia-Social and Behavioral Sciences.** 106, 1677-1686.

Lingkard, K., Singlaton, V. L. (1977). Totalphenal analysis Automation and comparison with manual method. **Am J Enol Vitic**. 28, 49-55.

Lister, E., & Wilson, P. (2001). **Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity**. New Zealand: Crop Research institute, Lincoln.

Lo, M., & Cheung, C. K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe acgeria* var. alba. **Food Chemistry**. 89(4), 533-539.

Merck, E. (1980). **Dyeing reagents for thinlayer and paper chromatography**. Damstadt: Merck.

Nguyen, Q. V., & Eun, J. B. (2011). Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research.** 5(13), 2798-2811.

Onorato, P., & Ambrosisa, A. (2014). Laboratory and multimedia in science teaching: experiments about magnetic force. **Procedia-Social and Behavioral Sciences.** 116, 1280–1287.

Pamok, P., Saenphet, S., Vinitketkumnuen, U., & Saenphet, K. (2012). Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. extracts on the colon cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**. 6(1), 139-145.

Que, F., Mao, L. C., & Zheng, X. J. (2007). In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.** 16, 196-203.

Ramamoorthy, P. K., & Bono, A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of Morinda Citrifolia fruit extracts from various extraction processes. **Journal of Engineering Science & Technology**. 2, 70-80.

Rang, H. P., Dale, M. M., & Ritter, J. M. (2000). **Pharmacology.** 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A., & Saura-Calixto, J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**. 20, 941-953.

Sever, S., Yurumezoglu, K., & Oguz-Unver, A. (2010). Comparison teaching strategies of videotaped and demonstration experiments in inquiry-based science education. **Procedia-Social and Behavioral Sciences.** 2, 5619–5624.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 46, 4113-4117.

Vichitphan, S., Vichitphan, K., & Sirikhansaeng, P. (2007). Flavonoid content and antioxidant activity of Krachai-dun (Kaempferia parviflora) wine. **KMITL Science and Technology**. 7, 97–105.

Wanger, H., & Bladt, S. (1996). **Plant drug analysis**. Berlin: Verlag.

Yang, J. H., et al. (2000). Antioxidant and related compounds. Baosci Biotechnol. **Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 61, 1646-1649.

Zhang, G. W., et al. (2006). Two new bioactive sesquiterpenes from the soft coral *Sinularia sp*. **Journal of Natural Products.** 20, 659-664.

GRAD VRU

ภาคผนวก

GRAD VRU

ภาคผนวก ก

ผลการทดสอบสารด้วยเทคนิค GC-MS

GRAD VRU

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

สาขากรุงเทพฯ : 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Bangkok Branch : 50 Phaholyothin Rd., Ladyao, Jatujak, Bangkok 10900 Thailand
Tel : (662) 561 4387-8, (662) 940 6881-3 Ext. 164, 218 Fax : (662) 579 4895, (662) 940 6881-3 Ext. 209
http://www.centrallabthai.com

Central Lab

วันที่ออก : 01 เมษายน 2558
เลขที่รายงาน :TR 58/11839
หน้า : 1 / 1

ใบรายงานผลการทดสอบ

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ			วิธีทดสอบอ้างอิง
	RT	%Area	%Match	
Bis(2-ethylhexyl)phthalate	70.84	89.24	91	In-house method based on GC-MS

อนุมัติผล[illegible]
([illegible])
ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการ
CERTIFIED
สาขากรุงเทพฯ

GRAD VRU

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น
รายงานผลการทดสอบห้ามไม่ถูกทำสำเนาเฉพาะเพียงบางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นทำทั้งฉบับ

ภาคผนวก ข

หนังสือเชิญผู้ทรงคุณวุฒิ

GRAD VRU

ที่ ศธ ๐๕๕๑.๑๒/ ก ๑๔๓

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปณจ. ประตูน้ำพระอินทร์
จ.ปทุมธานี ๑๓๑๘๐

๗ มีนาคม ๒๕๕๘

เรื่อง ขอเชิญเป็นผู้ทรงคุณวุฒิ

เรียน รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงษ์ แสง-ชูโต

ด้วยนายเสริมพงศ์ เดชสูงเนิน รหัสนักศึกษา ๕๓G๕๔๖๗๐๑๐๓ นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี ซึ่งอยู่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง “ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” โดยมีผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศมล ผาสุข เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ มีความจำเป็นต้องทำการเก็บข้อมูล เพื่อประกอบการทำวิทยานิพนธ์

จึงเรียนมาเพื่อโปรดให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ทั้งนี้ได้มอบหมายให้ นายเสริมพงศ์ เดชสูงเนิน เบอร์โทรศัพท์ ๐๘๖ – ๘๙๗๙๓๖๙ เป็นผู้ประสานงานโดยตรง มหาวิทยาลัยฯ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าคงจะได้รับความร่วมมือจากท่านด้วยดี จึงขอขอบคุณล่วงหน้ามา ณ โอกาสนี้

GRAD VRU

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร์ธนิกษ์ ศิริโวหาร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

ที่ ศธ ๐๕๕๑.๑๒/ ว ๖๔๗

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปณจ. ประตูน้ำพระอินทร์
จ.ปทุมธานี ๑๓๑๘๐

๑๖ มีนาคม ๒๕๕๘

เรื่อง ขอเชิญเป็นผู้ทรงคุณวุฒิ

เรียน รองศาสตราจารย์ ดร.วิลาศ พุ่มพิมล

ด้วยนายเสริมพงศ์ เดชสูงเนิน รหัสนักศึกษา ๕๓G๕๔๖๗๐๑๐๓ นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี ซึ่งอยู่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง “ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” โดยมีผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศมล ผาสุข เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ มีความจำเป็นต้องทำการเก็บข้อมูล เพื่อประกอบการทำวิทยานิพนธ์

จึงเรียนมาเพื่อโปรดให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ทั้งนี้ได้มอบหมายให้ นายเสริมพงศ์ เดชสูงเนิน เบอร์โทรศัพท์ ๐๘๖ – ๘๙๗๙๓๖๙ เป็นผู้ประสานงานโดยตรง มหาวิทยาลัยฯ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าคงจะได้รับความร่วมมือจากท่านด้วยดี จึงขอขอบคุณล่วงหน้ามา ณ โอกาสนี้

GRAD VRU

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร์ธนิกษ์ ศิริโวหาร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

ที่ ศธ ๐๕๕๑.๑๒/ก ๑๔๗

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปณจ. ประตูน้ำพระอินทร์
จ.ปทุมธานี ๑๓๑๘๐

๑๖ มีนาคม ๒๕๕๘

เรื่อง ขอเชิญเป็นผู้ทรงคุณวุฒิ

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ เพ็งพัด

ด้วยนายเสริมพงศ์ เดชสูงเนิน รหัสนักศึกษา ๕๓๘๕๔๖๗๐๑๐๓ นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี ซึ่งอยู่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง “ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบฮ่วนง็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” โดยมีผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศมล ผาสุข เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ มีความจำเป็นต้องทำการเก็บข้อมูล เพื่อประกอบการทำวิทยานิพนธ์

จึงเรียนมาเพื่อโปรดให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ทั้งนี้ได้มอบหมายให้ นายเสริมพงศ์ เดชสูงเนิน เบอร์โทรศัพท์ ๐๘๖ – ๘๙๗๙๓๖๙ เป็นผู้ประสานงานโดยตรง มหาวิทยาลัยฯ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าคงจะได้รับความร่วมมือจากท่านด้วยดี จึงขอขอบคุณล่วงหน้ามา ณ โอกาสนี้

GRAD VRU

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร์ธนิกษ์ ศิริโวหาร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

ภาคผนวก ค

เอกสารประกอบบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์

GRAD VRU

เอกสารประกอบบทปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์
เรื่อง ประสิทธิภาพและองค์ประกอบทางเคมีของการสกัดหยาบใบฮ่วนง็อก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดย
นายเสริมพงศ์ เดชสูงเนิน

GRAD VRU

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

เอกสารประกอบบทปฏิบัติการที่ 1
เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

บทนำ

เทคนิคการแยกของผสมและ/หรือการทำสารให้บริสุทธิ์สามารถใช้วิธีการตกผลึก การกลั่น การสกัด และวิธีการแยกสารอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้แพร่หลายมาก คือ เทคนิคโครมาโทกราฟี ซึ่งโครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นคำศัพท์ที่ตั้งขึ้นโดย Mikhail Tsvet นักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซียในปี ค.ศ. 1906 หมายถึง การใช้เทคนิคต่าง ๆ เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีออกจากกัน โดยปล่อยให้สารผ่านเข้าไปในวัสดุที่มีรูพรุน แล้วสารจะแยกกันได้เนื่องจากอัตราการเคลื่อนที่ต่างกัน โดยการใส่สารตัวอย่างที่ปลายด้านหนึ่งของวัสดุมีรูพรุนทำให้ได้ส่วนอยู่กับที่ จากนั้นก็ปล่อยให้ส่วนเคลื่อนที่ไหลผ่าน องค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างจะแยกออกจากกันได้เนื่องจากมีความต่างกันในการกระจายตัวระหว่างส่วนอยู่กับที่กับส่วนเคลื่อนที่ องค์ประกอบใดมีความจำเพาะหรือ

สัมพรรคภาพ (Affinity) กับส่วนอยู่กับที่มาก จะเคลื่อนที่ไปได้ช้า ดังนั้นเทคนิคนี้สามารถแยกสาร ที่ผสมกันอยู่โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคอยู่กับที่ (Stationary Phase) หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน สารต่างชนิดกันจึงเดินทางผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ออกมากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกขึ้น ในปัจจุบันมีเทคนิคทางโครมาโทกราฟีหลายประเภท แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โครมาโทกราฟีแบบต่าง ๆ

โครมาโทกราฟี	วัฏภาคอยู่กับที่	วัฏภาคเคลื่อนที่	หลักการทำงาน
Paper Chromatography	Liquid	Liquid	Partition
Thin-Layer Chromatography	Solid	Liquid	Adsorption
Column Chromatography	Solid	Liquid	Adsorption
Gas-Solid Chromatography	Solid	Gas	Adsorption
Gas-Liquid Chromatography	Liquid	Gas	Partition
Liquid-Solid Chromatography	Solid	Liquid	Adsorption
Liquid-Liquid Chromatography	Liquid	Liquid	Partition

เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และยังมีการใช้งานกันทั่วไป ได้แก่ รงคเลขผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) และคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

เทคนิครงคเลขผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

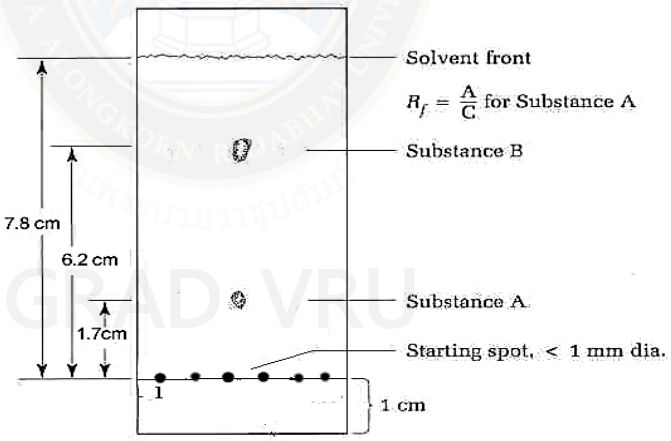
เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่าง ๆ ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสม หลักการของ TLC วัฏภาคอยู่กับที่จะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก แผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกบาง ๆ สารจะถูกแต้มไว้ที่ใกล้ ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะที่ใส่ วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตื้น ๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับ ก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคอยู่กับที่และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่ แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคอยู่กับที่ได้น้อยจึงเคลื่อนที่ไปได้ดีด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัฏภาคอยู่กับที่ได้ดี เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบ ประโยชน์ของ TLC นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังรวมถึงการใช้ในการทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (โดยการใช้วัฏภาคอยู่กับที่ชนิดเดียวกับที่จะบรรจุลงคอลัมน์ในการทำ TLC) รวมถึงการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค TLC ได้แก่ อลูมินา และซิลิกาเจล เช่นเดียวกับที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนั้นระบบตัวทำละลาย รวมถึงความเร็วช้าของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้วและไม่มีขั้วจึงมีแนวโน้มทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยทั่ว ๆ ไปแล้วนิยมใช้ตัวดูดซับเป็นอลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย ๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ และนิยมใช้ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น

TLC Fingerprint เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก อาศัยเทคนิคการแยกสารที่ผสมกันอยู่ให้แยกออกจากกันเป็นส่วน ๆ โดย ผลของการแยกสารที่เรียกว่า Chromatogram ต่อจากนั้นจึงนำผล Chromatogram มาฉีดพ่นด้วยน้ำยาเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้มีความชัดเจนมากขึ้น แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ Chromatogram ของสารมาตรฐาน มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและการตรวจเอกลักษณ์ของวัตถุดิบสมุนไพร เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบเชิงคุณภาพ ที่สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้ในครั้งเดียวกัน

ขั้นตอนการทำ TLC

การทำ TLC ต้องเริ่มด้วยการเตรียมแผ่นที่มีวัฏภาคอยู่กับที่เคลือบอยู่ โดยทั่วไปสามารถทำได้เองโดยจุ่มแผ่นกระจก (ขนาดประมาณแผ่นสไลด์ที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์) ที่สะอาดลงในสารแขวนลอยที่ข้นเหลว (Slurry) ของสารที่เป็นวัฏภาคอยู่กับที่ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ยกขึ้นมาให้ได้การเคลือบที่สม่ำเสมอแล้วทิ้งให้แห้ง ในปัจจุบันมีการทำแผ่น TLC สำเร็จรูปซึ่งเคลือบวัฏภาคอยู่กับที่ไว้บนแผ่นอะลูมิเนียมบาง ๆ จำหน่าย โดยมักผสมสารเรืองแสง เช่น ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS) ไว้ด้วย ซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตตำแหน่งของสารโดยใช้แสง UV ได้สะดวก

การเตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 1 % แม้ว่าตัวอย่างนั้นจะเป็นของเหลวอยู่แล้วก็ตาม แล้วแต้ม (Spotting) ลงบนแผ่น TLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำแผ่นดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์หรือถัง TLC ที่มีตัวทำละลายใส่ไว้เพียงเล็กน้อยโดยให้ระดับตัวทำละลายต่ำกว่าระดับที่แต้มสารตัวอย่าง (อย่าให้ท่วมจุดสารตัวอย่าง) และอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย (ซึ่งต้องเตรียมไว้ก่อนหน้านี้โดยใช้กระดาษกรองบุไว้ที่ผนังด้านในของบีกเกอร์ แล้วปิดด้วยกระจกนาฬิกา) คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC ขอบของรอยเปียกของตัวทำละลายนี้เรียกว่า Solvent Front เมื่อมาเกือบถึงปลายด้านบนของแผ่น (ห่างจากปลายบนลงมา 0.5-1 เซนติเมตร) ก็ให้รีบเอาแผ่นออก ใช้ดินสอขีดบ่งรอย Solvent Front ไว้ เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f (Rate of Flow) ต่อไประหว่างที่รอต้องแน่ใจว่าแผ่น TLC อยู่ในระบบปิดตลอดเวลา ค่า R_f นี้เป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทำการแต้มไปถึงตำแหน่งสุดท้ายของมัน เทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (จาก Spotting ถึง Solvent Front) เนื่องจากสารต่างชนิดกันจะถูกดูดซับด้วยวัฏภาคอยู่กับที่ได้ไม่เท่ากัน จึงถูกตัวทำละลายพาขึ้นมาสูงได้ไม่เท่ากัน การแยกจึงเกิดขึ้น ค่า R_f ของสารแต่ละชนิดในวัฏภาคอยู่กับที่และวัฏภาคเคลื่อนที่หนึ่ง ๆ จะเป็นค่าคงที่และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตำแหน่งการแต้มสาร ระดับตัวทำละลายในการทำTLC และการคำนวณค่า R_f
ที่มา: http://www.organicchem.org/oc2web/lab/exp/lp/lptlc.html

การหาค่า R_f เป็นค่าเฉพาะตัวของสาร ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและตัว ดูดซับ ดังนั้นการบอกค่า R_f ของสารแต่ละชนิดจึงต้องบอกชนิดของตัวทำละลายและตัวดูดซับเสมอ ค่า R_f สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (cm)}}$$

เนื่องจากตัวทำละลายจะเคลื่อนที่เร็วกว่าสารที่จะแยก ค่า $R_f < 1$ เสมอ สารต่างชนิดกันจะมีค่า R_f แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นเราจึงสามารถใช้ค่า R_f มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารได้ กล่าวคือ ถ้าสารใดมีความสามารถในการละลายสูงจะมีค่า R_f มาก

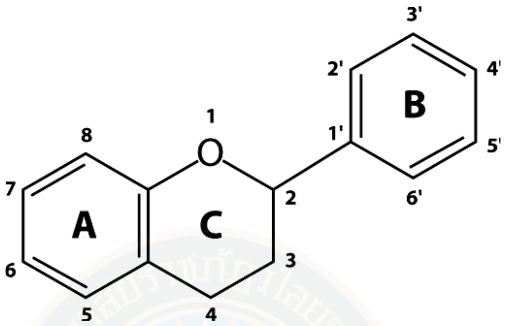
ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์ เป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (Phenylbenzopyrones) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 – C6) เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (Benzene Ring) 2 วง (A and B) เชื่อมต่ออยู่กับวงแหวนไพแรน (Heterocyclicpyran Ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง (C) (ภาพที่ 2) โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐาน ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่

1. ฟลาโวนอล (Flavonols) เช่น เคอร์ซิติน (Quercetin) แคมป์เฟอรอล (Kaempferol) ไมริซิติน (Myricetin)
2. ฟลาโวน (Flavones) เช่น ลูติโอลิน (Luteolin) อาพิจินิน (Apigenin) ไครซิน (Chrysin)
3. ฟลาวาโนน (Flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (Hesperetin) นารินจินิน (Naringenin) อีริโอดิคทิออล (Eriodictyol)
4. ฟลาวานอล (Flavanols) เช่น แคทิชิน (Catechin) แกลโลแคทิชิน (Gallocatechin) อีพิแคทิชิน (Epicatechin) อีพิแกลโลแคทิชิน (Epigallocatechin) อีพิแคทิชิน-3-แกลเลต (Epicatechin-3-gallate) อิพิแกลโลแคทิชิน-3-แกลเลต (Epigallocatechin-3-gallate)
5. ฟลาวาโนนอล (Flavanonols) เช่น แทกซิโฟลิน (Taxifolin)
6. ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) เช่น เดดซีน (Daidzein) จีนิสตีน (Genistein) ไกลซิตีน (Glycitein) ฟอร์โมโนเนติน (Formononetin)
7. แอนโธไซยานิดิน (Anthocyanidins) เช่น ไซยานิดิน (Cyinolone), เดลฟินิดิน (Delphinidin) มาลวิดิน (Malvidin) พีลาร์โกนิดิน (Pelargonidin) พีโอนิดิน (Peonidin) พีทูนิดิน (Petunidin)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารเมแทบอไลท์ขั้นทุติยภูมิในพืชสร้างจากกรดอะมิโนที่มีวงแหวน (Aromatic Amino Acids) ได้แก่ Phenylalanine, Tyrosine และ Malonate โดยทำหน้าที่เป็นสารให้สีที่สำคัญในพืช ช่วยในการกรองรังสีอัลตราไวเลตและการช่วยตรึงไนโตรเจน ฟลาโวนอยด์พบได้ใน ผักผลไม้ ธัญพืช พืชตระกูลถั่ว เครื่องเทศ สมุนไพร ลำต้น กิ่งก้านดอก และเมล็ด รวมถึงเครื่องดื่มบางชนิด เช่น ชา โกโก้ เบียร์และไวน์ เป็นต้น ฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่จับอยู่กับน้ำตาลในรูปเบต้าไกลโคไซด์ (β-glycosides) ในระบบทางเดินอาหารฟลาโวนอยด์จะถูกย่อยโดยน้ำย่อย และถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กเป็นส่วนใหญ่ ส่วนฟลาโวนอยด์ที่ไม่ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กและฟลาโวนอยด์ที่ถูกดูดซึมแล้วถูกขับออกทางน้ำดีจะเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ และถูกสลายโดยจุลชีพบางชนิดทำให้ได้กรดฟีนอลิกซึ่งจะถูกดูดซึมกลับเข้ากระแสเลือดอีกครั้ง โดยฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกระแสเลือดก็จะไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย และสามารถถูกกำจัดได้ทางไต

โดยที่เซลล์ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ฟลาโวนอยด์อาจผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งอาจทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเปลี่ยนแปลงไปได้



ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)
ที่มา: http://www.smj.ejnal.com/e-journal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1829

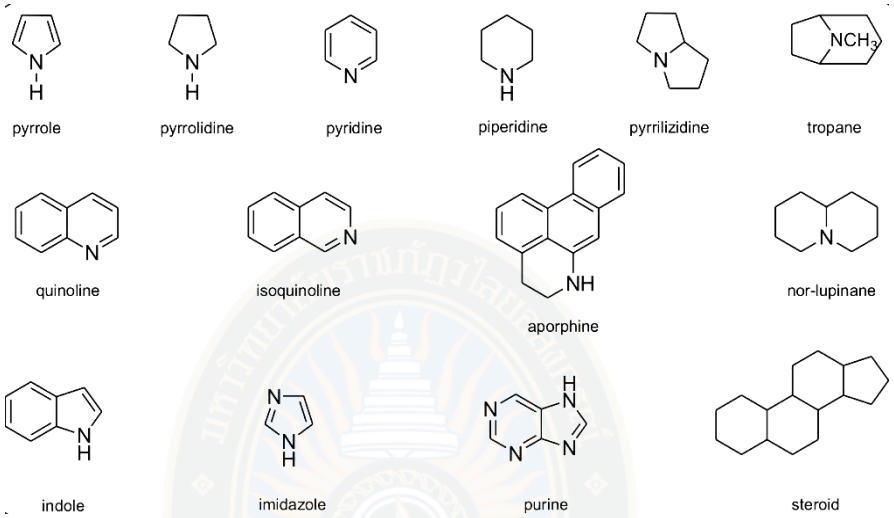
อัลคาลอยด์

อัลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีธาตุไนโตรเจน (Nitrogen; N) อยู่ภายในโมเลกุล โดยอาจมีไนโตรเจนอยู่หนึ่งอะตอมหรือมากกว่าหนึ่งก็ได้ ในรูปของเอมีน (amine) เอมีนออกไซด์ (Amine Oxide) หรืออาจพบอยู่ในรูปของเอไมด์ (Amide) และอิไมด์ (Imide) อีกด้วย ไนโตรเจนในอัลคาลอยด์ได้มาจากกรดอะมิโน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์ชนิดต่าง ๆ โดยทั่วไปอัลคาลอยด์จะมีคุณสมบัติเป็นเบสเนื่องจากมีไนโตรเจน แต่ทั้งนี้จะมีความเป็นเบสมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนของไนโตรเจนภายในโมเลกุล อัลคาลอยด์มักมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอย่างเด่นชัด ในธรรมชาติจะพบอัลคาลอยด์มากในพืชชั้นสูง พบน้อยในพืชชั้นต่ำ สัตว์ และจุลินทรีย์ ในพืชชั้นสูงนั้นสามารถพบอัลคาลอยด์ได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืชเช่น ใบ ดอก ผล เมล็ด ราก และเปลือก เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิด

การแบ่งกลุ่มของอัลคาลอยด์ทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมคือแบ่งตามโครงสร้างทางเคมี ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1) อัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนอยู่นอกวง (Non-heterocyclic Alkaloids) และ 2) อัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนของวง (Heterocyclic Alkaloids) ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามโครงสร้างหลักได้เป็นกลุ่มไพโรล (Pyrrole) ไพโรลิดีน (Pyrrolidine) ไพริดีน (Pyridine) พิเพอริดีน (Piperidine) ไพโรโลซิดีน (Pyrrolozidine) โทรเพน (Tropane) ควิโนลีน (Quinoline) ไอโซควิโนลีน (Isoquinoline) อะพรอฟีน (Aporphine) นอร์ลูพิเนน (Nor-lupinane) อินโดล (Indole) อิมิดาโซล (Imidazole) พิวรีน (Purine) และสเตอรอยด์ (Steroid) โครงสร้างของอัลคาลอยด์กลุ่มต่าง ๆ (ภาพที่ 3)

หน้าที่ของอัลคาลอยด์ในพืชยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีการสันนิษฐานว่าอัลคาลอยด์อาจทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนเพื่อสร้างโปรตีน ช่วยควบคุมการเจริญเติบโต หรือการงอกของเมล็ดพืชบางชนิด ช่วยป้องกันพืชจากแมลงต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่มักมีรสขม

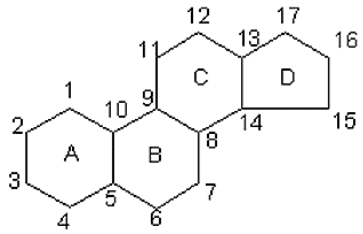
และมีพิษ หรืออัลคาลอยด์อาจเป็นสารที่ได้จากการทำลายพิษที่เกิดขึ้น ในกระบวนการเมตาโบลิซึมของพืช อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่ามีพืชจำนวนมากกว่า 80 % ที่ไม่สร้างและไม่สะสมอัลคาลอยด์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารอัลคาลอยด์อาจเป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืชโดยทั่วไป



ภาพที่ 3 โครงสร้างหลักของอัลคาลอยด์กลุ่มต่าง ๆ ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนของวง
ที่มา: http://www.henriettes-herb.com/PAs/PAs-chemistry.html

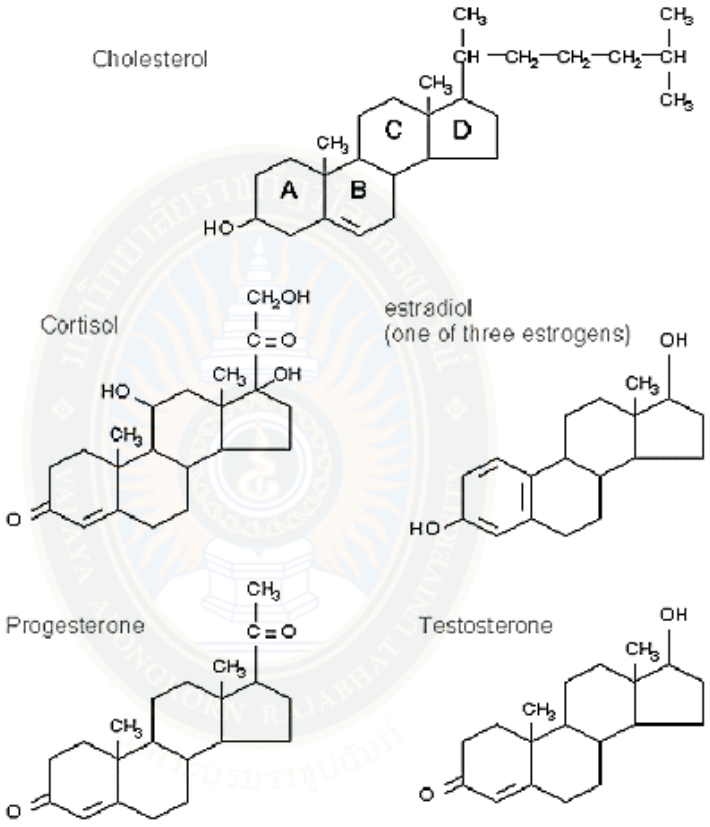
สเตียรอยด์ – เทอร์ปีน

เป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่มีวงแหวน 4 วง มีชื่อเรียกว่า เพอร์ไฮโดรไซโคลเพนทาโน-ฟีแนนทรีน (Perhydrocyclopentanophenanthrene) มีลักษณะเป็นวงแหวน 6 เหลี่ยม 3 วง และวงแหวน 5 เหลี่ยม 1 วง เชื่อมกัน (ภาพที่ 4) สเตอรอยด์ที่พบในร่างกายส่วนใหญ่ได้จากอาหารที่รับประทานเข้าไป มีสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ในธรรมชาติสเตอรอยด์แต่ละชนิดจะมีจำนวนคาร์บอนและตำแหน่งฟังก์ชันนอลที่จับกับวงแหวนเพอร์ไฮโดรไซโคลเพนทาโนฟีแนนทรีนต่างกัน ทำให้มีหน้าที่และสมบัติแตกต่างกันไป



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ Steroids ที่เป็นเพอร์ไฮโดรไซโคลเพนทาโนฟีแนนทรีน
ที่มา: http://www.promma.ac.th/chemistry/MainBridgePage.html

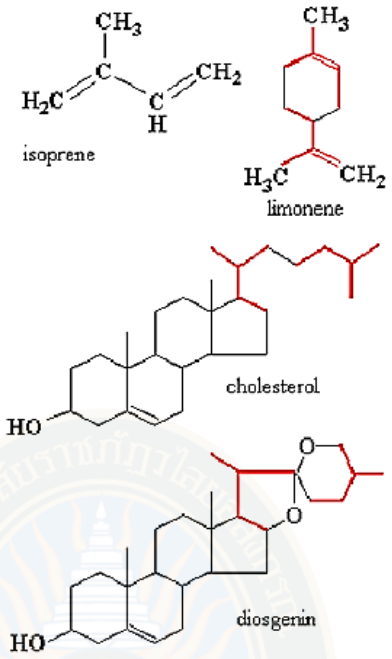
สเตอรอยด์ที่รู้จักกันดีคือ คอเลสเทอรอล (Cholesterol) เป็นสเตอรอยด์ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดน้ำดี (Bile Salt) ฮอร์โมนเพศชาย (Androgen) ฮอร์โมนเพศหญิง (Estrogen) และวิตามินดี เป็นต้น อาหารที่ให้คอเลสเทอรอลสูง ได้แก่ ตับ ไข่แดง สมองสัตว์ หอย กุ้ง ปลาหมึก เป็นต้น



ภาพที่ 5 โครงสร้างของ Cholesterol และอนุพันธ์ของ Cholesterol
ที่มา: http://www.web-books.com/mobio/Free/images/Ch1B3.gif

เทอร์พีน (Terpene) เป็นลิพิดที่เกิดจากหน่วยไอโซพรีน (Isoprene) ตั้งแต่ 2 หน่วยขึ้นไปมาต่อกัน สารไอโซพรีนเป็นสารที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ที่มีชื่อเรียกตามระบบว่า 2- เมทิล-1, 3 บิวตาไดอีน (2-methyl-1, 3 Butadiene) (ภาพที่ 6) เทอร์พีนเป็นลิพิดที่พบมากในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืช ทำให้พืชมีกลิ่นและรส ตัวอย่างของเทอร์พีน ได้แก่ ไลโมนีนจากมะนาว เมนทอลจากใบสะระแหน่ และการบูรจากต้นการบูร เป็นต้น นอกจากนี้เทอร์พีนยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินต่าง ๆ เช่น วิตามิน เอ ดี อี เค เป็นต้น

GRAD VRU



ภาพที่ 6 โครงสร้างของ Isoprene และอนุพันธุ์ของ Isoprene
ที่มา: http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/Chm452/gif/isoprene.gif

เอกสารอ้างอิง

นันทวัน บุญยประภัศร, และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2542). **สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน.** กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด.

แม้น อมรสิทธิ์, และอมร เพชรสม. (2539). **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์.

Feiser, L.F., & Williamson, K. L. (1998). **Organic Experiments.** 8th ed. New York: Houghton Mifflin Co.

บทปฏิบัติการทดลองที่ 1
เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

วัตถุประสงค์

1. สามารถบอกหลักการ และเลือกตัวทำละลายเพื่อใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมได้
2. สามารถแยกสารด้วยเทคนิครงคเลขผิวบางได้

หลักการ/ทฤษฎี

คำว่า Chromatography มาจากภาษากรีก Chromatos แปลว่า สี ความหมายเดิมของ Chromatography หมายถึงการแยกของผสมที่มีสี ในปัจจุบันหมายถึงเทคนิคที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสารกับวัฏภาคอยู่กับที่ (Stationary Phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) วัฏภาคอยู่กับที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว ถ้าเป็นของแข็งการแยกจะเป็นแบบดูดซับ (Adsorption) ถ้าเป็นของเหลวการแยกสารจะเป็นแบบแบ่งละลาย (Partition) วัฏภาคเคลื่อนที่อาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊สทำหน้าที่พาสารแต่ละชนิดในสารผสมให้เคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้

กระบวนการโครมาโทกราฟีเกิดขึ้นเนื่องจากสารที่ต้องการแยกมีการเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ซึ่งเนื่องมาจากแรง 2 แรง คือ

1. แรงผลักดัน (Propelling Forces) เกิดเนื่องจากการไหลของตัววัฏภาคเคลื่อนที่หรือความสามารถในการละลายของสารในตัววัฏภาคเคลื่อนที่
2. แรงดึง (Retarding Forces) หมายถึง แรงที่วัฏภาคอยู่กับที่ดึงดูดสารไว้ เช่น แรงวาน-เดอวาลส์ แรงพันธะไฮโดรเจน เป็นต้น

Thin Layer Chromatography (TLC)

เป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorb Chromatography) ของผสมที่ถูกแยกจะถูกดูดซับโดยวัฏภาคอยู่กับที่ที่เป็นของแข็ง วัฏภาคอยู่กับที่ที่นิยมใช้คือ ซิลิกาเจล ($SiO_2.XH_2O$) และอลูมินา (Al_2O_3) ในขณะเดียวกันวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวก็จะพาสารให้เคลื่อนที่ไป เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกันจะได้รับแรงดึงและแรงผลักดันต่างกันด้วย ดังนั้นสารแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อย จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นเป็นแถบ ๆ เรียกว่า Chromatogram วัฏภาคอยู่กับที่จะทำหน้าที่ 2 ลักษณะ คือ รับโมเลกุลของสารเข้ามาสัมผัสกับตัวมัน เรียกว่าเกิด Adsorption และปล่อยให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ต่อไป เรียกว่าเกิด Desorption

วัฏภาคอยู่กับที่มีหลายชนิด ในการเลือกใช้จึงต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยกตัวอยู่กับที่ที่ดีจะต้องไม่ละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยกและต้องไม่เป็นตัวเร่งของปฏิกิริยาเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในขบวนการโครมาโทกราฟีมีหลายชนิด ซึ่งเรียงลำดับความเป็นขั้วจากต่ำ ไปหาขั้วสูง ดังนี้ เฮกเซน < คาร์บอนเตตราคลอไรด์ < เบนซีน < อีเทอร์ < คลอโรฟอร์ม < เอทิลอะซิเตต < อะซีโตน < เอทานอล < น้ำ

ในบางกรณีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้มีความเป็นขั้วไม่พอ และวัฏภาคอยู่กับที่มีความเป็นขั้วสูงกว่า ไม่ก็มีความเป็นขั้วมากเกินไป จึงไม่สามารถจะใช้ตัวเคลื่อนที่ชนิดเดียวได้ จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม เพื่อที่จะได้ตัวทำละลายที่เหมาะสม

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุ ผงใบฮว่านง็อก

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
3. เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)
4. เครื่องส่องรังสีเหนือม่วง (UV-lamp)
5. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical Balances)
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
7. พีเอชมิเตอร์ (pH Meter)
8. เครื่องแก้วสำหรับพ่นน้ำยาตรวจวัด (TLC Sprayer)
9. ถังทำ ทีแอลซี (TLC Chamber)
10. เครื่องแก้วพื้นฐาน

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ทำ TLC โดยบ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์
    (1) สารมาตรฐานเบต้า-ซิโตสเตอรอล (ß-Sitosterol)
    (2) น้ำยาวานิลลิน-กรดซัลฟูริก (Vanillin-H_2SO_4)
    (3) เฮกเซน (Hexane) AR Labscan
    (4) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) AR Labscan
2. สารเคมีที่ใช้ทำ TLC โดยบ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทอัลคาลอยด์
    (1) สารมาตรฐานควินินซัลเฟต (Quinine Sulfate)
    (2) น้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Reagent)
    (3) กรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล (0.1 N Sulphuric Acid) AR APS
    (4) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (5% Ammonium Hydroxide) AR AP
    (5) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium Sulphate Anhydrous) AR Ajax Finechem
    (6) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) AR Labscan
    (7) เมทานอล (Methanol) AR Labscan

3. สารเคมีที่ใช้ทำ TLC โดยบ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทฟลาโวนอยด์
    (1) สารมาตรฐานรูทิน (Rutin) หรือสารมาตรฐานเคอร์เซติน (Quercetin)
    (2) น้ำยาเนเจอรัลโปรดักส์-โพลีเอธิลลีนไกลคอล (NP/PEG,)
    (3) เมทานอล (Methanol) AR Labscan
4. ตัวทำละลายที่ใช้
    (1) เมทานอล (Methanol) AR Labscan,
    (2) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) AR Labscan,
    (3) โทลูอีน (Toluene) AR Labscan,
    (4) เอทิลอะซิเตต (Ethyl Acetate) AR Labscan,
    (5) กรดฟอร์มิก (Formic Acid) AR APS
    (6) กรดอะซิติก (Acetic Acid) AR APS
    (7) น้ำกลั่น (H_2O)

วิธีการทดลอง

1. การทำ TLC Fingerprint ที่บ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ (ß-sitosterol)

1.1 ชั่งผงใบฮว่านง็อก 1 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน 10 มิลลิลิตร 3 รอบ (รอบละ 30 นาที) บนเครื่องกวนละลายสาร (Magnetic Stirrer)

1.2 นำสารสกัดจาก ข้อ 1.1 มากรองผ่านกระดาษกรอง ชะด้วยเฮกเซนเล็กน้อย แล้วระเหยสารด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) ให้แห้ง นำสารที่ได้มาละลายด้วย คลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเบต้า-ซิโตสเตอรอล 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในคลอโรฟอร์ม

1.4 นำสารละลายตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร มาแต้มบนแผ่นTLC เทียบกับสารละลายสารมาตรฐาน ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปใส่ในถังทำ TLC ที่อิ่มตัวด้วยน้ำยา โทลูอีน-เอธิลอะซิเตท-กรดฟอร์มิค (ให้นักศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด) ให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 5 เซนติเมตร

1.5 นำแผ่น TLC ที่ได้ทิ้งให้แห้ง แล้วพ่นด้วยน้ำยาวานิลลิน-กรดซัลฟิวริก (Vanillin-H_2SO_4) จากนั้น นำไปอบที่ 100-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 นาที สังเกตแถบสีและบันทึกผลการทดลอง

2. การทำ TLC Fingerprint ที่บ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทอัลคาลอยด์

2.1 ชั่งผงใบฮว่านง็อก 5 กรัม เติมกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มอล 60 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) 20 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 หรือ 42

2.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.1 มาปรับ pH ให้เป็นด่าง (pH 8-9) ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

2.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.2 มาสกัดอัลคาลอยด์อิสระด้วยคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร 3 รอบ (รอบละ 10 นาที) ในกรวยแยก (Separatory Funnel) รวมชั้นคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ชั้นล่างมากำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส บนกระดาษกรองเบอร์ 41 หรือ 42 แล้วนำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) นำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล 0.5 มิลลิลิตร

2.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟต 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล

2.5 นำสารละลายตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร และสารละลายสารมาตรฐานมาแต้มบนแผ่น TLC ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปใส่ในถังทำ TLC ที่อิ่มตัวด้วยน้ำยา คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (ให้นักศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด) ให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 5 เซนติเมตร

2.6 นำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วพ่นด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Reagent) ทิ้งไว้ให้แห้ง สังเกตแถบสี และบันทึกผลการทดลอง

3. การทำ TLC Fingerprint ที่บ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทฟลาโวนอยด์

3.1 ชั่งผงใบฮว่านง็อก 0.5 กรัม อุ่นกับเมทานอล 5 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำร้อน (Water Bath) ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองผ่านกระดาษกรอง

3.2 นำสารที่ได้จากข้อ 3.1 ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) ให้แห้ง แล้วละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร

3.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานรูทิน (Rutin) 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในเมทานอล

3.4 นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายสารมาตรฐาน 3 ไมโครลิตร มาแต้มบนแผ่น TLC ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปใส่ในถังทำ TLC ที่อิ่มตัวด้วยน้ำยา เอธิลอะซิเตท-กรดฟอร์มิค-กรดอะซิติก-น้ำ (ให้นักศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด) ให้น้ำยาซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 5 เซนติเมตร

3.5 นำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้ให้แห้งแล้วพ่นด้วยน้ำยาเนเจอรัลโปรดักส์พอลิเอธิลลีนไกลคอล (NP/PEG) (พ่น PEG ก่อนแล้วทิ้งไว้ให้แห้งจึงพ่นตามด้วย NP) ทิ้งไว้ให้แห้งและสังเกตการเรืองแสงภายใต้รังสียูวีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และบันทึกผลการทดลอง

รายงานการทดลองที่ 1
เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

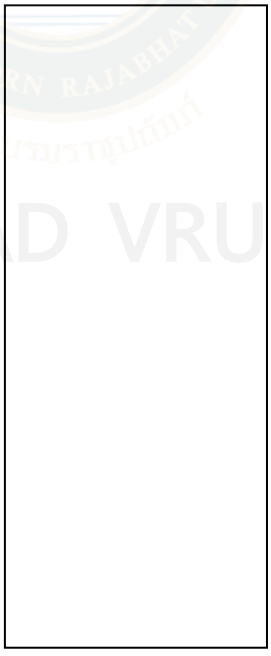
วันที่ทำการทดลอง.....
กลุ่มการทดลองที่.....
สมาชิกในกลุ่ม 1.....
2.....
3.....

วัตถุประสงค์การทดลอง

.....
.....
.....
.....
.....

ผลการทดลอง

1. การทำ TLC Fingerprint ที่บ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์



แผ่น TLC ที่แยกได้

ค่า R_f ของสารมาตรฐาน.....
ค่า R_f ของสารตัวอย่าง..... ...

GRAD VRU

แผ่น TLC เมื่อพ่นด้วยน้ำยาวานิลลินก่อนการอบ มีลักษณะอย่างไร

.....

.....

แผ่น TLC เมื่อพ่นด้วยน้ำยาวานิลลินหลังการอบ มีลักษณะอย่างไร

.....

.....

2. การทำ TLC Fingerprint ที่บ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทอัลคาลอยด์

แผ่น TLC ที่แยกได้

ค่า R_f ของสารมาตรฐาน.....

ค่า R_f ของสารตัวอย่าง.....

แผ่น TLC ก่อนพ่นด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ มีลักษณะอย่างไร

.....

.....

แผ่น TLC หลังพ่นด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ มีลักษณะอย่างไร

.....

.....

GRAD VRU

3. การทำ TLC Fingerprint ที่บ่งชี้ด้วยสารมาตรฐานประเภทฟลาโวนอยด์

แผ่น TLC ที่แยกได้

ค่า R_f ของสารมาตรฐาน.....

ค่า R_f ของสารตัวอย่าง.....

แผ่น TLC ก่อนพ่นด้วยน้ำยา NP/PEG วัดที่ 366 นาโนเมตร มีลักษณะอย่างไร

.....

.....

แผ่น TLC หลังพ่นด้วยน้ำยา NP/PEG วัดที่ 366 นาโนเมตร มีลักษณะอย่างไร

.....

.....

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

คำถามท้ายการทดลอง

1. จงอธิบายหลักการแยกสารด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง (TLC Fringerprint)

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. การทำ TLC Fringerprint มีประโยชน์อย่างไร จงอธิบาย

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. จงอธิบายหลักการในการเลือกตัวทำละลายเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการทำ TLC Fingerprint

.....

.....

.....

.....

4. จงบอกอัตราส่วนของตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์หา สเตอรอยด์-เทอปีนส์ อัลคาลอยด์ และฟลาโวนอยด์

.....

.....

.....

.....

5. ในใบฮว่านง็อกพบสารกลุ่มใดเป็นองค์ประกอบมากที่สุด เพราะเหตุใด

.....

.....

.....

.....

.....

.....

GRAD VRU

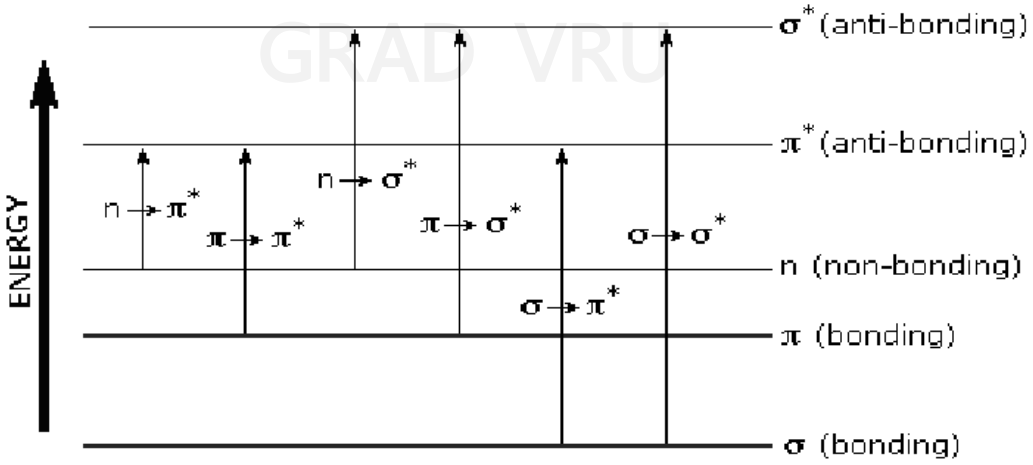
เอกสารประกอบบทปฏิบัติการที่ 2
เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮว่านง็อก
ด้วยอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

บทนำ

เครื่องอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่าความเข้ม (Intensity) ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่างซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงในช่วงรังสียูวีหรือแสงขาวที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่าง ๆ ตามกฎของ เบียร์ แลมเบิร์ต (Beer-Lambert's Law) ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

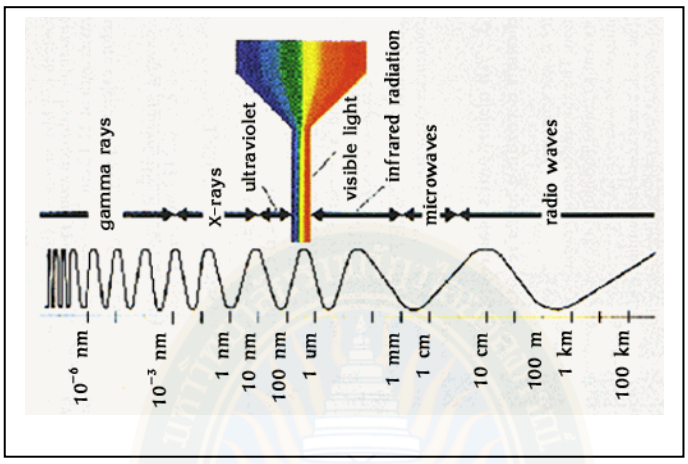
การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรสโกปี จะอาศัยหลักการพื้นฐานคือเมื่อโมเลกุลได้รับพลังงานคลื่นแสงในช่วง ยูวี-วิสิเบิล อิเล็กตรอนที่อยู่ภายในโมเลกุล จะถูกกระตุ้นให้มีระดับพลังงานที่สูงขึ้น แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ระดับพลังงานเมื่ออิเล็กตรอนที่อยู่ภายในโมเลกุลถูกกระตุ้นเมื่อได้รับพลังงานคลื่นแสงในช่วง ยูวีวิสิเบิล

ที่มา: http://www.cem.msu.du/~reusch/VirtualText/Spectropy/UV-Vis/spectm.htm

รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic Radiation) รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า ประกอบด้วยช่วงคลื่นที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน นับตั้งแต่ช่วงคลื่นวิทยุที่มีพลังงานน้อยที่สุดจนถึงรังสีแกมมาที่มีพลังงานมากที่สุด แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงช่วงคลื่นต่าง ๆ ในรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า
ที่มา: http://www.yorku.ca/eye/spectrum.gif&imgrefurl

คลื่นวิทยุ (Radio Wave) เป็นช่วงคลื่นที่ใช้ในการส่งข่าวสารจากเครื่องส่งของสถานีไปยังเครื่องรับตามบ้าน คลื่นวิทยุมีสมบัติที่น่าสนใจคือ สามารถหักเหและสะท้อนได้ในชั้นบรรยากาศซึ่งเต็มไปด้วยอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อคลื่นวิทยุเคลื่อนที่ในชั้นบรรยากาศจะสามารถสะท้อนกลับสู่ผิวโลกได้ สมบัติข้อนี้ ทำให้สามารถใช้คลื่นวิทยุในการสื่อสารเป็นระยะทางไกลได้

คลื่นไมโครเวฟ (Microwave) ใช้ในการส่งสัญญาณโทรทัศน์ และใช้ในเตาไมโครเวฟเป็นต้น คลื่นนี้จะไม่สะท้อนกลับในชั้นบรรยากาศแต่จะทะลุออกนอกโลกไปเลย เราจึงสามารถส่งคลื่นไมโครเวฟไปยังดาวเทียมที่โคจรรอบโลกเพื่อสะท้อนคลื่นกลับมายังสถานีรับที่อยู่ห่างไกลออกไปได้ นอกจากนี้คลื่นไมโครเวฟยังสะท้อนจากผิวโลหะได้ดี ซึ่งได้มีการนำเอาสมบัติข้อนี้ไปใช้ประโยชน์ในการตรวจหาอากาศยานที่เรียกว่า เรดาร์ ได้อีกด้วย

รังสีอินฟราเรด (Infrared) ปัจจุบันมีการนำเอาอินฟราเรดมาใช้ในอุปกรณ์หลายอย่าง เช่น ใช้ในระบบควบคุมที่เรียกว่า รีโมทคอนโทรล (Remote Control) หรือการควบคุมระยะไกล ซึ่งเป็นระบบสำหรับควบคุมการทำงานของอุปกรณ์ต่าง ๆ จากระยะไกล โดยรังสีอินฟราเรดจะเป็นตัวนำคำสั่งจากเครื่องควบคุมไปยังเครื่องรับ

ในทางทหารได้มีการนำเอารังสี อินฟราเรด มาใช้เกี่ยวกับการควบคุมให้อาวุธนำวิถีเคลื่อนที่ไปยังเป้าหมายได้อย่างถูกต้อง ปัจจุบันมีการส่งสัญญาณด้วยเส้นใยนำแสง (Optical Fiber) โดยใช้รังสีอินฟราเรด เป็นพาหะนำสัญญาณ เนื่องจากถ้าใช้แสงธรรมดานำสัญญาณ อาจจะถูกรบกวนจากแสงภายนอกได้ง่าย

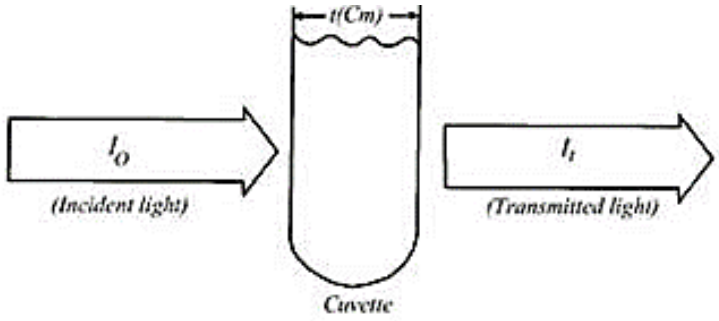
แสงที่มองเห็น (Visible Light) เป็นแสงสีขาวที่เกิดจากการรวมกันของแสงสีต่าง ๆ มีสีหลักอยู่ 7 สี คือ สีม่วง สีคราม สีน้ำเงิน สีเขียว สีเหลือง สีแสด และสีแดง มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-800 นาโนเมตร เมื่อแสงสีขาวตกกระทบวัตถุแล้วทำให้มองเห็นวัตถุเป็นสีใดแสดงว่าวัตถุนั้นดูดกลืนแสงสีอื่นหมดแต่สะท้อนแสงสีที่ตามองเห็นออกมา แต่ถ้าวัตถุนั้น ๆ ดูดกลืนแสงทุกสีไว้ได้หมดจะมองเห็นวัตถุเป็นสีดำ

แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Light) เป็นแสงที่มีคุณสมบัติในการทำให้อิเล็กตรอนของอะตอมเกิดการเปลี่ยนระดับพลังงาน (Electronic Transition) รังสีอัลตราไวโอเลตไม่สามารถทะลุผ่านสิ่งกีดขวางหนา ๆ ได้ แต่สามารถทำให้เชื้อโรคบางชนิดตายได้ ร่างกายของมนุษย์ก็เช่นกัน ถ้าถูกแสงนี้เป็นเวลานานอาจเกิดอันตราย ตัวอย่างเช่น ผิวหนังไหม้เกรียม เยื่อบุลูกตาถูกทำลาย และอาจทำให้เกิดเป็นมะเร็งของผิวหนังได้

รังสีเอ็กซ์ (X-Rays) สามารถเคลื่อนที่ทะลุผ่านสิ่งกีดขวางหนา ๆ ได้ ดังนั้นในทางการแพทย์จึงใช้รังสีเอ็กซ์ฉายผ่านร่างกายมนุษย์ไปตกบนฟิล์มเพื่อตรวจดูลักษณะผิดปกติของอวัยวะภายใน ส่วนเจ้าหน้าที่ด่านตรวจก็ใช้ตรวจหาอาวุธปืนหรือระเบิดในกระเป๋าโดยไม่ต้องเปิดกระเป๋า นอกจากนี้เมื่อฉายรังสีเอ็กซ์ที่มีความยาวคลื่นประมาณ 10^{-10} เมตร (ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของอะตอมและระยะห่างระหว่างอะตอมของผลึก) ผ่านก้อนผลึก อะตอมที่จัดเรียงตัวกันอย่างมีระเบียบในก้อนผลึกจะทำให้รังสีเอ็กซ์เลี้ยวเบนอย่างมีระเบียบ เมื่อศึกษาลักษณะการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ก็จะสามารถคำนวณหาระยะห่างระหว่างอะตอมและวิธีการจัดเรียงตัวของอะตอม ทำให้ทราบโครงสร้างของผลึกแต่ละชนิดได้

รังสีแกมมา (Gamma Ray) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูงกว่ารังสีเอ็กซ์ เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่สูงที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสของธาตุ เนื่องจากรังสีแกมมาสามารถทำลายเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ เราจึงนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์เพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง

กฎแห่งการดูดกลืนแสง กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's Law) กล่าวว่า แสงที่มีความยาวคลื่นเดี่ยวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มของแสง แต่จะขึ้นอยู่กับความหนาของตัวกลาง ซึ่งแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การดูดกลืนแสงตามกฎของแลมเบิร์ต

ที่มา: http://www.aquatoyou.com/index.php/2013-05-16-04-06-08/874-uv-vis-spectrophotometer

จากกฎของแลมเบิร์ตจะได้สมการ

$$I_t = I_o \times 10^{-kt} \text{ ----------(1)}$$

กฎของเบียร์ (Beer's Law) กล่าวว่า แสงที่ถูกดูดกลืนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารในของเหลว ซึ่งเมื่อคำนวณเช่นเดียวกับกฎของแลมเบิร์ต จะได้สมการ

$$I_t = I_o \times 10^{-kc} \text{ ----------(2)}$$

เมื่อรวมกฎทั้งสองเข้าด้วยกัน (Beer-Lambert's Law) โดยการบวกสมการที่ (1) และสมการที่ (2) จะได้สมการใหม่ดังนี้

$$I_t = I_o \times 10^{-\varepsilon ct} \text{ ----------(3)}$$

แต่แสงส่องผ่าน (Transmittance, T) มีค่าเท่ากับ I_t/I_o และแสงที่ถูกดูดกลืน (Absorbance, A หรือ Optical Density, OD) มีค่าเท่ากับ Log (I_o/I_t) ดังนั้น

$$A = \varepsilon ct \text{ ----------(4)} \quad \text{หรือ } A = -\log T \text{ ----------(5)}$$

เมื่อ ε = Molar Absorptivity สารแต่ละชนิดมีค่า ε คงที่ในแต่ละช่วงคลื่น มีหน่วยเป็น $mole^{-1}cm^{-1}$

c = ความเข้มข้นของสารในหน่วยโมล/ลิตร

T = ความหนาของสารละลายในหน่วยเซนติเมตร

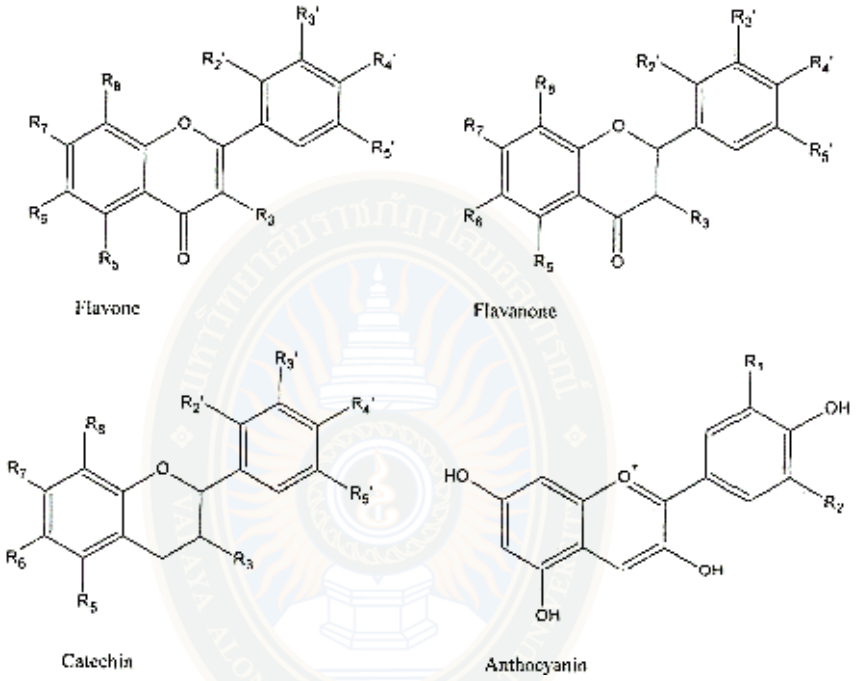
การเบี่ยงเบนจากกฎของเบียร์ (Deviation from Beer's Law)

เราทราบมาแล้วจากกฎของเบียร์ว่า ค่าการดูดกลืนจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น ดังนั้นเมื่อเราพล็อตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A) กับความเข้มข้น (c) เมื่อความหนาของเซลล์คงที่จะได้กราฟเส้นตรง แต่ในบางครั้งพบว่าอาจจะเกิดการเบี่ยงเบนได้ความสัมพันธ์ที่ไม่เป็นเส้นตรง ซึ่งอาจเป็นการเบี่ยงเบนในเชิงบวก (Positive Deviation) คือค่าการดูดกลืนแสงให้แนวโน้มสูงกว่าปกติ ทำให้กราฟที่ได้โค้งขึ้นหรือเป็นการเบี่ยงเบนเชิงลบ (Negative Deviation) คือค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มต่ำลง ทำให้กราฟโค้งลง

ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นใบราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด และพืชแต่ละชนิดจะมีฟลาโวนอยด์แต่ละประเภทในความเข้มข้นที่ต่างกันไป ในสัตว์สามารถพบได้บ้าง โดยเชื่อว่ามาจากพืชที่บริโภคเข้าไปมากกว่าการเกิดชีวสังเคราะห์ในร่างกายของสัตว์เอง ฟลาโวนอยด์มีอยู่มากมายหลายชนิด เป็นสารประกอบฟีนอล (Phenolic Compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (Polyphenol) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก (Aromatic Ring) ที่มีจำนวน

หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl Group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาล ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (Glycoside) สารประกอบ Flavonoids ได้แก่ Flavonol, Flavanone, Flavone, Isoflavone, Flavonol, Catechin และ Anthocyanins เป็นต้น



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างสารประกอบฟลาโวนอยด์
ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2951/flavonoid

กลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ รวมถึงกลุ่มโพลีฟีนอลอื่น ๆ มี 3 กลไก คือ

1. สารคีเลต (Chelating Agent) สารโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างเป็นออร์โธไดไฮดรอกซีฟีนอลิก (Ortho-dihydroxyphenolic) ทำหน้าที่จับหรือฟอร์มพันธะโคออร์ดิเนตกับโลหะหนัก เช่น ทองแดง และเหล็ก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ รวมทั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

2. สารต้านออกซิเดชันโดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain Breaking Antioxidant) ในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระ เช่น Lipid Alkoxyl และ Peroxyl Radicals เป็นต้น โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น ดังแสดงในปฏิกิริยา (1) หลังจากที่ฟลาโวนอยด์ถูกออกซิไดซ์แล้วจะได้อนุมูลของฟลาโวนอยด์ฟีนอกซิลเป็นผลิตผล และอนุมูลที่ได้นี้มีความเสถียรมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีการ Delocalize ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา

Flavonoid-OH + $R^{\bullet}$ ⟶ Flavonoid-$O^{\bullet}$ + RH (1)

โดยที่

Flavonoid-OH = สารฟลาโวนอยด์
$R^{\bullet}$ = อนุมูลอิสระในร่างกาย
Flavonoid-$O^{\bullet}$ = อนุมูลฟีนอกซิล

3. ทำหน้าที่ Regenerate วิตามินอี (α-tocopherol) โดยจะรีดิวซ์อนุมูล α- tocopheroxyl กลับเป็น α-tocopherol เหมือนเดิม ทำให้สามารถทำหน้าที่เป็น Antioxidant ได้ต่อไป ดังแสดงในสมการ

α-tocopheryl-OH + $R^{\bullet}$ → α-tocopheryl-$O^{\bullet}$ + RH

α-tocopheryl-$O^{\bullet}$ + Flavonoid-OH → α-tocopheryl-OH + Flavonoid-$O^{\bullet}$

มีการรายงานการศึกษามากมายถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฟลาโวนอยด์ ที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านมะเร็ง การต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านอาการแพ้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงฤทธิ์อื่น ๆ เช่น สารกลุ่มไอโซฟลาโวนสามารถออกฤทธิ์เป็น Phytoestrogen โดยจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ทำให้สามารถใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในผู้หญิงที่ใกล้หมดประจำเดือน รวมทั้งใช้ป้องกันมะเร็งที่มีความสัมพันธ์กับฮอร์โมน เช่น มะเร็งเต้านม และมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น ซึ่งพบว่าคุณสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์

เอกสารอ้างอิง

ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. (2539). **เทคนิคทางเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ประกายพรึก.
แม้น อมรสิทธิ์, และอมร เพชรสม. (2539). **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.

บทปฏิบัติการทดลองที่ 2
เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮว่านง็อก
ด้วยอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

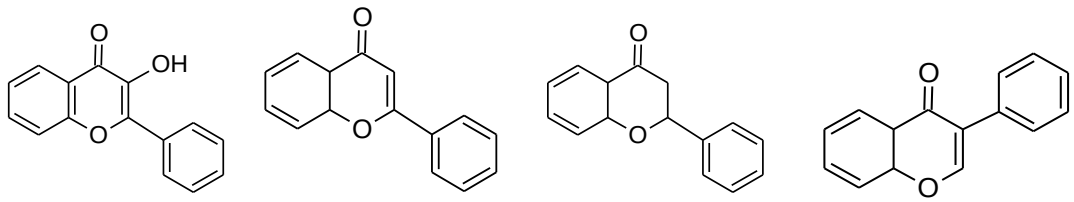
วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทร-โฟโตมิเตอร์
2. สามารถบอกหลักการทำงานของเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

หลักการ/ทฤษฎี

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอก และพบได้มากในธรรมชาติได้แก่ พืชผัก ผลไม้ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติ ตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์และฟลาโวนอยด์ไปจนถึงโครงสร้างโพลิเมอรที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น แม้วาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่พบว่าปริมาณโดยเฉลี่ยที่ คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัม ถึง 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ไดรับต่อวัน สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญ เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิตในการสลายลิ่มเลือดเหล่านี้ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกและมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮร์ดรอกซี่อย่างน้อย 1 หมู่ ในที่นี้จะกล่าวถึงสารกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม ตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้างโดยเฉพาะที่วงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซีแทนที่บนวงอะโรมาติกในโมเลกุลตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาแวน(Flanvanes), ฟลาวาโนน (Flavanols), ฟลาวานอล (Flavanols), ฟลาโวนอล (Flavonols), ฟลาโวน (Flavonoes) และแอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidins) เป็นต้น โครงสร้างของสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์บางชนิด แสดงดังภาพที่ 1



Flavonol Flavone Flavanone Isoflavone

ภาพที่ 1 โครงสร้างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์
ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2951/Flavonoid

เครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่าความเข้มของแสง ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่าง ๆ ตามกฎของ เบียร์-แลมเบิร์ต ค่าการดูดกลืนแสงของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ ส่วนประกอบของเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. แหล่งกำเนิดแสง แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ ด้วยหลอดกำเนิดแสง มีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง ตัวอย่างแหล่งกำเนิดแสงช่วงยูวีวิสิเบิล ใช้หลอด H_2 and D_2 Lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทรสโกปี UV Molecular Absorption และช่วงวิสิเบิลใช้หลอด Tungsten /halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทรสโกปีเป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

2. ตัวควบคุมแสง ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบ ๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (Prism) หรือ เกรตติ้ง (Grating)

3. เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (Cell Sample) บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวทท์ (Cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้

เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกาและควอร์ตซ์ (Quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีวิสิเบิล

4. ส่วนประมวลผล ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (Photo Multiplier Tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (Silicon Diode Detector)

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุ สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer)
2. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical Balances)
3. เครื่องเขย่า (Shaker)
4. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
5. คิวเวทท์ (Cuvette)
6. เครื่องแก้วพื้นฐาน

สารเคมี

1. เอทานอล (Ethanol)
2. โซเดียมไนไตร ($NaNO_2$)
3. อลูมิเนี่ยมคลอไรด์ ($AlCl_3$)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
5. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

นำใบฮว่านง็อกมา 5 กรัม บดให้ละเอียด เติมเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากัน 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารละลายมาตรฐานรูทิน (Rutin) 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (1.0, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

การเตรียมสารที่ใช้ทำปฏิกิริยา

การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง $NaNO_2$ 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง $AlCl_3$ 10 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ โดยชั่ง NaOH 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร

การเตรียมสารไร้ตัวอย่าง (Blank)

ปิเปตน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 นาที เติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

การหาปริมาณพลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบทั้งหมด

1. ปิเปตสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ที่เวลา 0 นาที เติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ที่เวลา 0 นาที เติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัม/มิลลิลิตร เทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของรูทินและค่าการดูดกลืนแสง

รายงานผลการทดลองปฏิบัติการที่ 2
เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮว่านง็อก
ด้วยอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

วันที่ทำการทดลอง.....
กลุ่มการทดลองที่.....
สมาชิกในกลุ่ม 1.....
2.....
3.....

วัตถุประสงค์การทดลอง

.....
.....
.....
.....
.....

ผลการทดลอง

1. ความเข้มข้น Rutin และค่าการดูดกลืนแสง

ความเข้มข้น Rutin (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.05	
0.1	
0.2	
0.4	
0.8	
1.0	

GRAD VRU

2. กราฟมาตรฐาน Rutin

3. ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับเท่าไร

.....
.....
.....
.....
.....

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

GRAD VRU

คำถามท้ายการทดลอง

1. จงเขียนสูตรโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ พร้อมชื่อ มาอย่างน้อย 3 ข้อ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการศึกษามีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างไร

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. จงอธิบายหลักการดูดกลืนแสงของเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

.....

.....

.....

.....

.....

4. ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานควรเป็นอย่างไร เพราะอะไร

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

GRAD VRU

เอกสารประกอบบทปฏิบัติการที่ 3
เรื่อง การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮว่านง๊อก
ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

อนุมูลอิสระ

คือโมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว อยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ 10^{-3}-10^{-10} วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัดด้วย Electron Spin Resonance (ESR) โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ (Free Radicals) และ Reactive Oxygen Species (ROS) มีดังนี้

Superoxide Anion Radical $O^{\bullet}_2$

Hydroxyl Radical $HO^{\bullet}$

Peroxide Radical $ROO^{\bullet}$

Peroxyl Radical $LOO^{\bullet}$

Hydrogen Peroxide H_2O_2

Ozone O_3

Singlet Oxygen $^1O_2$

Hydrogen Radical $H^{\bullet}$

Methyl Radical $CH^{\bullet}_3$

ชนิดของอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย
2. อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย
    2.1 การติดเชื้อ ทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส
    2.2 การอักเสบชนิดไม่ทราบสาเหตุ (Autoimmune Diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเก๊าท์
    2.3 รังสี สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสียและเขม่าจากเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ ยาฆ่าแมลง

โดยหลักการทางเคมีอนุมูลอิสระ และ ROS เกิดโดยปฏิกิริยาการแยกอย่างสมมาตร (Symmetric Separation)

$$X - X \text{ ------> } X^{\bullet} + X^{\bullet}$$

อนุมูลอิสระอื่น ๆ

$$X^{\bullet} - HR \text{ ------> } HX + R^{\bullet}$$

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น จำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือ ระบบแอนตี้ออกซิ-แดนท์ (Antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสาร (Substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสาร (Substrate) เหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตาม มีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบแอนตี้ออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า Oxidative Stress ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่าง ๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุ ของการแก่ (Aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่าง ๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune Disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้น ๆ มาก่อน (Reoxygenation Injury, Reperfusion Injury) รวมไปถึงโรคมะเร็ง เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ สาร ต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบไนโตรเจน และแคโรทีนอยด์ บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารและยา ได้พยายามพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือเบต้าแคโรทีน รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤกษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) กลูตาไธโอน-เพอรอกซิเดส (Glutathione Peroxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase) หรือสารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (Albumin) บิลิรูบิน (Bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (Ceruloplasmin) กลูตาไธโอน (Glutathione) ทรานสเฟอริน

(Transferrin) ยูบิควินอล (Ubiquinol) และยูเรต (Urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมดจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative Stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าว อนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของรางก่าย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผัก เครื่องเทศ องุ่น และสมุนไพร ได้รับความสนใจ และศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic Antioxidants) สารประกอบ ฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ Propyl Gallate, 2-butylated Hydroxyanisole, 3-butylate Hydroxyanisole, BHT (Butylated Hydroxytoluene) และ Tertiary Butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และ รสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang, et al., 2000)

2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural Antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (Non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) เช่น แซนโธน (Xanthone) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (Aromatic Hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (Functional Group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบ โพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ Ortho-dihydroxyl Phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชั่น คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) (Sanchez-Moreno, et al., 2000)

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีหลายกลไก ได้แก่ ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) ยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet Oxygen Quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Metal Chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain- breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (Enzyme Inhibition) การสกัดและการตรวจสอบฤทธิ์ของสารในอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิก สารกลุ่มนี้มีหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Tocopherol, Tocotrienol, Oryzanols (Lai, et al., 2007), Caffeic Acid, Syring Acid, Rutin, Epicatechin, Catechin,

Gallic Acid, Vanilic Acid, p-coumaric Acid, Feruric Acid และ Quercetin (Que, et al., 2007) รวมทั้งสารฟลาโวนอยด์ (Vichitphan, et al., 2007; Ramamoorthy & Bono, 2007) โดยทั่วไปการสกัดสารประกอบฟีนอลิกมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีความแตกต่างกันตามแต่ลักษณะและองค์ประกอบของสาร ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ น้ำ เมทานอล (Methanol) เอทานอล (Ethanol) เอธิลอะซิเตต (Ethyl acetate) (Ramamoorthy & Bono, 2007; Lai, et al., 2007) และตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}), อะซีโตน (Acetone, C_3H_6O), คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$), ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether) หรือ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbontetracloride, CCl_4) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระมักประกอบด้วยสารหลายชนิดที่ทำงานเสริมกันจึงจะมีประสิทธิภาพสูงในการทำงาน

วิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความจำเพาะต่อสารแตกต่างกัน โดยปกติแล้วการตรวจสอบมักจะสรุปผลจากหลายวิธีร่วมกันเพื่อทำให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องยิ่งขึ้น การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน มีหลายวิธีไดแก

1. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT) เช่น วิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC) และวิธี Total Radical–trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

2. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron Transfer, ET หรือ SET) เช่น วิธี Diphenyl–1–picrylhydrazyl Assay (DPPH) (Que, et al., 2007), วิธี The Ferric Reducing Ability of Plasma Assay (FRAP) (Alia, et al., 2003; Ramamoorthy & Bono, 2007) วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), Lipid Peroxidation Reducing Power และ Metal Chelating Ability (Lai, et al., 2007)

GRAD VRU

เอกสารอ้างอิง

ระวิวรรณ แกวอมตวงศ, และทรงพร จึงมั่นคง. (2549). ฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. **วารสารวิชาการ ม.อบ.** 8(2), 76-88.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine.** 46, 531-542.

เอกสารประกอบบทปฏิบัติการที่ 3
เรื่อง การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮว่านง๊อก
ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

วัตถุประสงค์

1. สามารถบอกหลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

2. สามารถวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮว่านง๊อกด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay ได้

หลักการ/ทฤษฎี

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (Outer Orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (Unpaired Electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain Reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ (Halliwell, 1991) โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่ว ๆ ไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้าโดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูล-อิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $R^{\bullet}$ แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ($R^{+\bullet}$) เช่น อนุมูล Pyridinyl ($NAD^{+\bullet}$) และประจุลบ ($R^{-\bullet}$) เช่น อนุมูล Superoxide ($O2^{-\bullet}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล Peroxyl ($ROO^{\bullet}$) หรืออนุมูล Thiyl ($RS^{\bullet}$) เป็นต้น ซึ่งจากคำจำกัดความนี้ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม ($Cl^{\bullet}$) และซิลเวอร์อะตอม ($Ag^{\bullet}$) เป็นต้น (Roberfroid & Calderon, 1995) อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl Radical ($HO^{\bullet}$), Superoxide Anionradical ($O2^{-\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน ดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบไอโมไลซิส (Imolysis)

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{-\bullet}$$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{+\bullet} + e^{-}$$

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบไนโตรเจน และแคโรทีนอยด์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสารประกอบฟีนอลิก มีหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Tocopherol, Tocotrienol, Oryzanols, Caffeic Acid, Syring Acid, Rutin, Epicatechin, Catechin, Gallic Acid, Vanilic Acid, p-coumaric Acid, Feruric Acid และ Quercetin รวมทั้งสารฟลาโวนอยด์ โดยทั่วไปการสกัดสารประกอบฟีนอลิกมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีความแตกต่างกันตามลักษณะและองค์ประกอบของสาร ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ น้ำ เมทานอล (Methanol) เอทานอล (Ethanol) เอธิลอะซิเตต (Ethyl Acetate) และตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}), อะซีโตน (Acetone, C_3H_6O), คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$), ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether) หรือ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbontetracloride, CCl_4)

การตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (Scavenging Activity) โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอมหรือการรีดิวซ์ อนุมูล DPPH (DPPH Radical, $DPPH^{\bullet}$) เป็นอนุมูลไฮโดรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวัดทำโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโต-มิเตอร์วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป (Antioxidant; AH) โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งสารละลายของอนุมูล DPPH มีสีม่วงในเอทานอล และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ตามสมการที่ [1]

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \quad \text{--------- [1]}$$

รายงานผลการทดลองเป็นค่า 50 % Effective Concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ให้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ เหลืออยู่ 50 % (Lo & Cheung, 2005) โดยคำนวณ % DPPH scavenging ตามสมการที่ [2]

$$\%\ DPPH\ scavenging = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} x\,100 \quad \cdots\cdots\cdots [2]$$

วิธีนี้มีข้อดี คือ ทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรตินอยดที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน แต่ข้อด้อยของวิธีนี้คืออนุมูล DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุ สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer)
2. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical Balances)
3. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
4. คิวเวทท์ (Cuvette)
5. เครื่องแก้วพื้นฐาน
6. ขวดวัดปริมาตร

สารเคมี

1. เอทานอล
2. สารละลายมาตรฐาน BHT และ BHA
3. สารอนุมูล DPPH
4. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

การเตรียมสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก โดยนำใบฮว่านง็อกมา 5 กรัม บดให้ละเอียด เติมเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากัน 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารสกัดหยาบใบฮว่านง็อก 0.010 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อช่วยการละลาย

นำมาเจือจางด้วย 99.99 % เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) 0.010 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อช่วยการละลาย

นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

การเตรียมสารละลายอนุมูล DPPH

ชั่ง DPPH 0.0237 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้ Stock Solution เข้มข้น 6×10^{-3} โมลาร์ เมื่อจะนำมาใช้ให้เจือจางให้เป็น 6×10^{-5} โมลาร์ โดยปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay:

นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ BHA โดยผสมสารละลายลงในหลอดทดลองตามตารางที่ 3.1 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

Reagents	Control (มิลลิลิตร)	Blank (มิลลิลิตร)	Sample (มิลลิลิตร)	Standard 1 (มิลลิลิตร)	Standard 2 (มิลลิลิตร)
สารสกัดสมุนไพร	-	1	1		
สารมาตรฐาน BHT	-			1	
สารมาตรฐาน BHA	-				1
99.99 % เอทานอล	1	1			
สารละลาย DPPH	1		1	1	1
ผสมสารทดสอบในแต่ละหลอดให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีในที่มืด จากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร					

ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารจะแสดงค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH scavenging) ดังสมการ

$$\% \ DPPH \ scavenging = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} x\,100$$

$Abs_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย DPPH

Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารทดสอบ

ในการรายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ จะรายงานด้วยค่า EC_{50} ซึ่งได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบ (แกน x) กับการตอบสนองที่เกิดขึ้นในรูปของ % DPPH Scavenging (แกน y) ซึ่งในการหาค่า EC_{50} จะแทนค่า % DPPH Scavenging เท่ากับ 50

รายงานผลการทดลองปฏิบัติการที่ 3
เรื่อง การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮ่วนง๊อก
ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

วันที่ทำการทดลอง.....
กลุ่มการทดลองที่.....
สมาชิกในกลุ่ม 1.....
2.....
3.....

วัตถุประสงค์การทดลอง

.....
.....
.....
.....

ผลการทดลอง

1. ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BHT และ % DPPH Scavenging

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	% DPPH Scavenging
31.25	
62.50	
125	
250	
500	

2. กราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BHT กับ % DPPH Scavenging

GRAD VRU

3. ค่า EC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน BHT

.....

.....

.....

.....

4. ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BHA และ % DPPH Scavenging

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	**% DPPH Scavenging**
31.25	
62.50	
125	
250	
500	

5. กราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BHA กับ % DPPH Scavenging

GRAD VRU

6. ค่า EC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน BHA

.....

.....

.....

.....

7. ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง และ % DPPH Scavenging

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	**% DPPH Scavenging**
31.25	
62.50	
125	
250	
500	

8. กราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารตัวอย่าง กับ % DPPH Scavenging

9. ค่า EC_{50} ของสารตัวอย่าง

.....

.....

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

GRAD VRU

คำถามท้ายการทดลอง

1. อนุมูลอิสระคืออะไร เกิดขึ้นได้อย่างไร และก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. สารต้านอนุมูลอิสระ คืออะไร

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. จงอธิบายหลักการ ข้อดี ข้อด้อย ของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. จงอธิบายความหมาย และหลักการคำนวณหาค่า EC_{50}

.....

.....

.....

.....

.....

.....

GRAD.VRU

ภาคผนวก ง

ค่าดัชนีความสอดคล้อง (IOC) ของบทปฏิบัติการ

GRAD VRU

แบบประเมินดัชนีความสอดคล้องของผู้ทรงคุณวุฒิที่มีต่อบทปฏิบัติการ ที่ 1

เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดกลุ่มสารสำคัญของพืชด้วยเทคนิครงคเลขผิวบาง

คำชี้แจง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิแสดงความคิดเห็นของท่าน ในแบบประเมินดัชนีความสอดคล้อง โดยใส่เครื่องหมาย (√) ลงในช่องความคิดเห็น พร้อมข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการนำไปพิจารณาปรับปรุงต่อไป

รายการขอความคิดเห็น	**ความคิดเห็น**			**ข้อเสนอแนะ**
	สอดคล้อง 1	**ไม่แน่ใจ 0**	**ไม่สอดคล้อง -1**	
ส่วนที่ 1 เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ				
1.1 ความถูกต้องของเนื้อหากับวัตถุประสงค์				
1.2 การเรียบเรียงเนื้อหากับวิธีการทดลอง				
ส่วนที่ 2 บทปฏิบัติการ				
2.1 วัตถุประสงค์กับชื่อเรื่อง				
2.2 หลักการ/ทฤษฎี กับวิธีการทดลอง				
2.3 วัตถุประสงค์กับวิธีการทดลอง				
2.4 วิธีการทดลองกับการส่งเสริมให้นักศึกษามีทักษะปฏิบัติการทดลอง				
ส่วนที่ 3 รายงานผลการทดลอง				
3.1 รายงานผลการทดลองกับวิธีการทดลอง				
3.2 คำถามท้ายการทดลองกับการส่งเสริมการคิดวิเคราะห์				
3.3 คำถามท้ายการทดลองกับวัตถุประสงค์				

ลงชื่อ.....ผู้ทรงคุณวุฒิ

แบบประเมินดัชนีความสอดคล้องของผู้ทรงคุณวุฒิที่มีต่อบทปฏิบัติการ ที่ 2
เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบฮ่วนง็อก
ด้วยอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

คำชี้แจง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิแสดงความคิดเห็นของท่าน ในแบบประเมินดัชนีความสอดคล้อง โดยใส่เครื่องหมาย (√) ลงในช่องความคิดเห็น พร้อมข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการนำไปพิจารณาปรับปรุงต่อไป

รายการขอความคิดเห็น	**ความคิดเห็น**			**ข้อเสนอแนะ**
	สอดคล้อง 1	**ไม่แน่ใจ 0**	**ไม่สอดคล้อง -1**	
ส่วนที่ 1 เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ				
1.1 ความถูกต้องของเนื้อหากับวัตถุประสงค์				
1.2 การเรียบเรียงเนื้อหากับวิธีการทดลอง				
ส่วนที่ 2 บทปฏิบัติการ				
2.1 วัตถุประสงค์กับชื่อเรื่อง				
2.2 หลักการ/ทฤษฎี กับวิธีการทดลอง				
2.3 วัตถุประสงค์กับวิธีการทดลอง				
2.4 วิธีการทดลองกับการส่งเสริมให้นักศึกษามีทักษะปฏิบัติการทดลอง				
ส่วนที่ 3 รายงานผลการทดลอง				
3.1 รายงานผลการทดลองกับวิธีการทดลอง				
3.2 คำถามท้ายการทดลองกับการส่งเสริมการคิดวิเคราะห์				
3.3 คำถามท้ายการทดลองกับวัตถุประสงค์				

ลงชื่อ.....ผู้ทรงคุณวุฒิ

แบบประเมินดัชนีความสอดคล้องของผู้ทรงคุณวุฒิที่มีต่อบทปฏิบัติการ ที่ 3

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฮ่วนงอก

ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

คำชี้แจง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิแสดงความคิดเห็นของท่าน ในแบบประเมินดัชนีความสอดคล้อง โดยใส่เครื่องหมาย (√) ลงในช่องความคิดเห็น พร้อมข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการนำไปพิจารณาปรับปรุงต่อไป

รายการขอความคิดเห็น	**ความคิดเห็น**			**ข้อเสนอแนะ**
	สอดคล้อง 1	**ไม่แน่ใจ 0**	**ไม่สอดคล้อง -1**	
ส่วนที่ 1 เอกสารประกอบบทปฏิบัติการ				
1.1 ความถูกต้องของเนื้อหากับวัตถุประสงค์				
1.2 การเรียบเรียงเนื้อหากับวิธีการทดลอง				
ส่วนที่ 2 บทปฏิบัติการ				
2.1 วัตถุประสงค์กับชื่อเรื่อง				
2.2 หลักการ/ทฤษฎี กับวิธีการทดลอง				
2.3 วัตถุประสงค์กับวิธีการทดลอง				
2.4 วิธีการทดลองกับการส่งเสริมให้นักศึกษามีทักษะปฏิบัติการทดลอง				
ส่วนที่ 3 รายงานผลการทดลอง				
3.1 รายงานผลการทดลองกับวิธีการทดลอง				
3.2 คำถามท้ายการทดลองกับการส่งเสริมการคิดวิเคราะห์				
3.3 คำถามท้ายการทดลองกับวัตถุประสงค์				

ลงชื่อ.....ผู้ทรงคุณวุฒิ

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล	เสริมพงศ์ เดชสูงเนิน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	8 มกราคม 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น
ที่อยู่ปัจจุบัน	299/106 หมู่ 7 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ รหัสไปรษณีย์ 36000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2553	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประวัติการทำงาน	-
ตำแหน่งหน้าที่การทำงานปัจจุบัน	ผู้ดำเนินกิจการร้านขายยาแผนปัจจุบัน
ที่ทำงานปัจจุบัน	ร้านคลังยาเภสัช 49 ถนนหฤทัย ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ รหัสไปรษณีย์ 36000
รางวัลหรือทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

GRAD VRU