รายงานวิจัย

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จากพรอพอลิส ของชันโรง

Determination of Flavonoids from Propolis Stingless Bee

โดย

ฮาซัน ดอปอ

อิสมะแอ เจ๊ะหลง

อัชมาน อาแด

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณบำรุงการศึกษาประจำปี 2560

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

หัวข้อวิจัย การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จากพรอพอลิสของชันโรง

ชื่อผู้วิจัย ฮาซัน ดอปอ อิสมะแอ เจ๊ะหลง อัชมาน อาแด

คณะ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร

มหาวิทยาลัย ราชภัฏยะลา

ปีงบประมาณ 2560

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากรังชันโรง พร้อมกับศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพอลิสจากรังชันโรง โดยจะทำการศึกษาตัวทำละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารฟลาโวนอยด์คือ ตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ 108.13 mg QE/g crude extract ส่วนอุณหภูมิที่สามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ได้ 85.8 mg QE/g crude extract และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึง 83.287±6.72 %

คำสำคัญ : ชันโรง พรอพอลิส ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก

Research Title Determination of Flavonoids from Propolis Stingless Bee
Researchers Hasan Daupor Isma-ae Chelong Ajaman Adair
Faculty Faculty of Science Technology and Agriculture
University Yala Rajabhat
Year 2017

Abstract

The purpose of this study was to analyze the amount of total flavonoid contents in the crude extracts from propolis stingless bee and to study the chemical compositions using thin layer chromatography technique and to study the antioxidants activity of crude extract from propolis stingless bee. The appropriate solvents and temperatures were investigated for extraction of flavonoids by analyzing the amount of flavonoids by means of aluminum chloride colorimetry method. The appropriate solvent for extraction of flavonoids was found Ethanol solvent. The quantitative analysis was 108.13 mg QE / g crude extract. The highest temperature of extractable flavonoids was 40 ° C, which was able to analyze for 85.8 mg QE / g crude extract. And by studying the antioxidant activity of the crude extract, the flavonoid was found to have the lowest concentration of antioxidants. It can antioxidant up to 83,287 ± 6.72%

Keywords: Stingless bee, Propolis, Flavonoid, Phenolic compound

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนงบบำรุงการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ประจำปีงบประมาณ 2560

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี (FTIR) และเครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)

ขอขอบคุณ ดร.อิมรอน มีชัย อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องทางวิชาการเบื้องต้น

ขอขอบคุณพ่อแม่ ภรรยา (นางสาวมาเรียม หะยีดอปอ) และลูก (ดช.มุฮซิน ดอปอ) และเพื่อน ๆ นักวิจัยทุกคนที่คอยให้กำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ชันโรงและพรอพอลิส	3
สารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์	4
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	9
วิธีการสกัด	13
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	10
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	15
การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer	19
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการวิจัย	22
กลุ่มตัวอย่าง	22
เครื่องมือ	22
อุปกรณ์	22
สารเคมี	23
วิธีการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด	23
การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry	24

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin	24
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัดพรอพอลิส	25
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค Thin layer chromatography	26
การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพรอพอลิสโดยใช้วิธี DPPH	27
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	28
ลักษณะของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	28
ผลของอุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัด	29
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี	32
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	33
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	34
บรรณานุกรม	35
ภาคผนวก	38
ภาคผนวก ก ลักษณะพรอพอลิสและสารสกัดฟลาโวนอยด์	38
ภาคผนวก ข กราฟสารละลายมาตรฐาน	39
ภาคผนวก ค สารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง	40
ภาคผนวก ง หลักฐานการเผยแพร่ในรูปแบบ proceeding ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2560 ณ มหาวิทยาลัยฟาฏอนี	41
ประวัตินักวิจัย	57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงผลผลิตร้อยละของสารสกัดพรอพอลิส	28
4.2	แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด	30
4.3	แสดงผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดฟลาโวนอยด์	31
4.4	แสดงค่า % DPPH radical inhibition ของสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก	4
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์	6
2.3	กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์	7
2.4	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวน	7
2.5	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอล	8
2.6	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาวาโนนอล	8
2.7	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาวาโนน	9
2.8	กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอล	12
2.9	กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล	13
2.10	การวางแผ่น TLC ที่แต้มสารแล้วลงในบีกเกอร์หรือขวดที่บรรจุตัวทำละลาย และการนำแผ่น TLC ที่ทำโครมาโตกราฟีเสร็จแล้วไปอังไอระเหิดของไอโอดีน	18
2.11	ตำแหน่งการแต้มสาร ระดับตัวทำละลาย solvent front ในการทำ TLC และการคำนวณ R_f	19
4.1	แสดงลักษณะของพรอพอลิสจากรังชันโรง	29
4.2	แสดงลักษณะของสารสกัดพรอพอลิสจากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด	30
4.3	แสดงสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารสกัด Flavonoid กับโลหะ Al	31
4.4	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin	31
4.5	ภาพแสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด	33
4.6	แสดงลักษณะการเปลี่ยนสีของสารตัวอย่างเมื่อเติมสารละลาย DPPH	34

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ชันโรงเป็นแมลงสังคมกลุ่มเดียวกับผึ้ง เรียกผึ้งกลุ่มนี้ว่า " Stingless bee " ไม่มีเหล็กใน ไม่ดุร้าย มีขนาดเล็กกว่าผึ้งพันธุ์ มีพฤติกรรมเก็บน้ำหวานจากดอกไม้และละอองเกสร (เรณู) มาใช้เป็นอาหาร ชันโรงสามารถสร้างน้ำผึ้งได้เช่นผึ้งหลวง ซึ่งคำว่าชันโรงนี้สันนิษฐานว่าน่าจะมาจากลักษณะการสร้างรัง เนื่องจากแมลงกลุ่มนี้ได้เก็บหายาง (gum) ชัน (resin) ของต้นไม้ แล้วนำมาอุดยาชันรอบ ๆ ปากรังและภายใน เพื่อป้องกันน้ำไหลซึมเข้ารัง และยังเป็นการป้องกันศัตรูบริเวณปากรัง ชันโรงสามารถพบได้ทั่วภูมิภาคของประเทศ โดยชันโรงจะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามภูมิภาค (สมพล, 2553) ชันโรงเป็นแมลงที่ปรับตัวเก่งอาศัยอยู่ในรูตามซอก โพรงต้นไม้ โพรงใต้ดิน คนสมัยก่อนคุ้นเคยกับการใช้ประโยชน์จากผลผลิตของชันโรง ทั้งน้ำผึ้งและชันในด้านต่าง ๆ เช่น ทำเป็นเชื้อไฟ ยางไม้ และไขผึ้งนำมาอุดฐานพระ อุดรูแคน แผ่นไม้ระนาดเอก และ โปงลาง เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์เกือบทั้งหมดได้มาจากการเก็บจากรังชันโรงในธรรมชาติ (อัญชลี, 2556) ปัจจุบันได้มีการค้นพบสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในชันหลายชนิด โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของชันคือสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

จากการศึกษาพบว่าพรอพอลิสมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด เช่น เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยสารประกอบเหล่านี้เองที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อโรค และเพิ่มภูมิคุ้มกัน (วันเพ็ญ, 2554) พรอพอลิสมีหลากหลายสารประกอบพอลีฟีนอล แต่ส่วนใหญ่จะเป็นจำพวกฟลาโวนอยด์ ในพรอพอลิสจะพบสารประกอบฟีนอลิกอยู่ 5,351.22 มิลลิกรัม/100 กรัม ในตัวทำละลาย 85% เอทานอล โดยใช้เทคนิควัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในพรอพอลิส โดยมาจากสารสกัด 50% เมทานอล มีอยู่ 124.76 มิลิกรัม/100 กรัม และในสารสกัด 85% เอทานอล มีอยู่ 4,946.53 มิลลิกรัม/100 กรัมโดยใช้เทคนิควัดค่าการดูดกลืนด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร สารสกัดที่ดีที่สุดของการหาสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในพรอพอลิส คือ 85% เอทานอล (mouhoubi-Tafinine et al., 2016) และนอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิสมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต หรือการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และเชื้อรา โดยป้องกันไม่ให้แพร่พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Cushnie and Andrew, 2005) ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งในการต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิสโดยวิธีการ DPPH Scavenging assay พบว่าสารสกัดพรอพอลิสมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ในตัว

ทำละลายที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-400 μg/mL ซึ่งที่ความเข้มข้น 10μg/mL สามารถยับยั้งได้ 4.20 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 400 μg/mL สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุด และสูงกว่าสารมาตรฐาน 1 mM alpha-tocopherol ที่ยับยั้งได้ 89.64 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ยังมีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่าสารมาตรฐาน 1 mM ascorbic acid โดยใช้เทคนิควัดการลดลงของสีด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (ภัทราพร และ ธัญญรัตน์, 2553) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิสสามารถต้านโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคหัวใจ เบาหวาน ต้อกระจก โรคหืดหอบ โรคหลอดลมอักเสบ โรคเกี่ยวกับระบบประสาท โรคมะเร็ง เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำชันมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น รักษาการติดเชื้อในช่องปาก รักษาเหงือกอักเสบ แก้อักเสบของผิวหนัง ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น สบู่ ยาสีฟัน ยาสระผม เป็นต้น (อัญชลี, 2556)

ดังนั้น ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ศึกษาวิธีการสกัดสารฟลาโวนอยด์และวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer โดยใช้ Aluminium Chloride Colorimetry Method และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพอลิส

1.3 ขอบเขตการวิจัย

นำตัวอย่างพรอพอลิสของรังชันโรงมาจากพื้นที่ป่าชุมชนปะเสยะวอ (6.72481N, 101.624683E) อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี มาทำการสกัดในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเอทานอล นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงจำนวนองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นว่ามีองค์ประกอบอยู่กี่ชนิดในพรอพอลิส

1.4.2 ทราบถึงปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในพื้นที่ตัวอย่าง

1.4.3 ทราบถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพอลิสจากรังชันโรง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชันโรงและพรอพอลิส

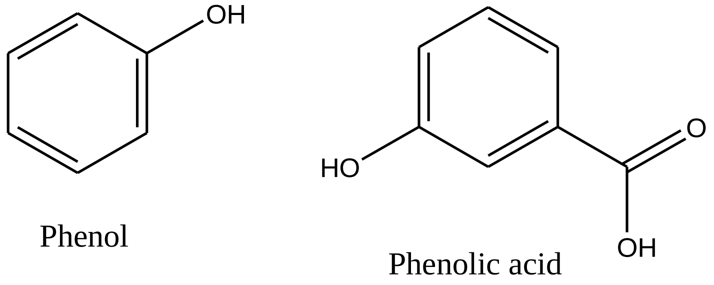
ชันโรงเป็นแมลงขนาดเล็กที่มีพฤติกรรมเก็บน้ำหวานจากดอกไม้ และละอองเกสร (เรณู) มาใช้เป็นอาหารคล้ายผึ้งแต่ชันโรงไม่มีเหล็กใน จึงไม่สามารถต่อยได้ ในประเทศไทยเราสามารถพบชันโรงได้ในทุกภาค โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภูมิภาค เช่น ทางภาคเหนือเรียกชันโรงที่มีขนดเล็กกว่า แมลงขี้ตึง หรือตัวขี้ตังนี้ แต่ถ้าเป็นชันโรงที่มีขนดใหญ่จะเรียกว่า ขี้ย้า โดยเรียกว่า ขี้ย้าดำ หรือขี้ย้าแดง ตามสีของลำตัวของชันโรง ภาคใต้เรียกขนาดเล็กว่า อุง หรืออุงแมลงโลม และเรียกชันโรงขนาดใหญ่ว่า อุงหมี (อุงแดงหรืออุงดำ) ภาคตะวันตกเรียกว่า ตัวตุ้งติ้งหรือตัวติ้ง จากพฤติกรรมการขนส่งเกสรที่ขาหลัง ส่วนภาคตะวันออกเรียก ชำมะโรงหรือแมลงอีโลม ส่วนคำว่าชันโรงน่าจะเป็นชื่อที่เรียกจากพฤติกรรมการเก็บชันของแมลงชนิดนี้ (อัญชลี, 2556) ชันโรงตรงข้ามกับผึ้งตรงที่ผึ้งจะใช้พรอพอลิส (Propolis) เพียงรอบนอกเท่านั้น ส่วนชันโรงจะสร้างรังโดยใช้ไขผึ้งบริสุทธิ์และซีรูเมน (Cerumen) ซึ่งเป็นไขผึ้งผสมกับพรอพอลิสที่มีอยู่มากมาย โดยพรอพอลิสเป็นส่วนผสมที่มีลักษณะเหนียวข้นเป็นยาง (Resinous) ได้มาจากยางของเปลือกไม้ที่ผึ้งงานรวบรวมมา โดยนำมาผสมกับไขผึ้งแล้วนำมาซ่อมแซมรัง อุดชันรอยรั่ว ตลอดจนรักษาความสะอาด และป้องกันการระบาดของเชื้อโรคภายในรังได้ด้วย โดยเมื่อมีซากของศัตรูผึ้งตายอยู่ในรังและมีขนาดใหญ่ที่ผึ้งไม่สามารถจะนำออกไปทิ้งนอกรังได้ ผึ้งจะนำสารพรอพอลิสมาหุ้มไว้ ทำให้ซากนั้นไม่เน่า (สรจักร, 2547) และการใช้ประโยชน์จากชันโรงนอกจากการผสมเกสรแล้ว ผลผลิตจากชันโรงที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้แก่น้ำผึ้งและชัน โดยน้ำผึ้งที่ได้จากชันโรงจะมีราคาสูงและมีสรรพคุณทางยา ส่วนชัน (propolis) เป็นส่วนของยางไม้ที่ชันโรงเก็บมาจากต้นพืชนำมารวมกับไขผึ้งที่ผลิตขึ้นภายในลำตัวของชันโรง โดยมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลายชนิด เช่น เทอร์ปีนอยด์ (Terpinoids) สเตอรอยด์ (Steroids) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) แต่โดยส่วนใหญ่แล้วองค์ประกอบทางเคมีของชันโรงจะเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อโรค และเพิ่มภูมิคุ้มกัน (วันเพ็ญ, 2554) โดยมีงานวิจัยของ ศิริวรรณ อธิคมกุลชัยในปี ค.ศ. 2008 ที่รายงานว่าพรอพอลิส (Propolis) หรือกาวผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ผึ้งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ประเทศในแถบยุโรปและแอฟริกามีการนำพรอพอลิส มาใช้ตั้งแต่อดีตโดยใช้ในการสมานแผล นอกจากนี้ยังมีการนำพรอพอลิสไปใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อในช่องปากและลำคอ ซึ่งปัจจุบันมีการนำพรอพอลิสมาใช้เป็นสมุนไพรอาหารเสริม รวมไปถึงอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เครื่องอุปโภค บริโภค โดยเน้นที่คุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ การนำไปใช้ในการรักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ เช่น สิว เริม โรคสะเก็ดเงิน โรคเหงือกอักเสบ นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ๆ อีก เช่น อะโรมาติกแอซิด

เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ คีโตน กรดไขมัน กรดอะมิโน และแอลกอฮอล์ ฯลฯ ทั้งนี้องค์ประกอบที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับแหล่งชนิดของพืชที่ผึ้งไปเก็บยางไม้มา (สุรีรัตน์ และคณะ, 2555) โดยมีงานวิจัยของ จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ในปี ค.ศ. 2008 ได้อธิบายถึงความสำคัญของพรอพอลิสจากชันโรง Trigona Leaviceps ที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้พรอพอลิส (propolis) จัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สำคัญอย่างหนึ่งของผึ้ง เป็นยางเหนียวมีสีค่อนข้างไปทางน้ำตาลเข้ม ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์โบราณ นอกจากนี้ก็ได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัดพรอพอลิสต่อการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรคชนิดต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ เซลล์มะเร็งหน้าอก และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

2.2 สารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์

2.2.1 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (Polyphenolic compound) เป็นกลุ่มสารที่ให้สีในพืช สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolism) จากพืช สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารอนุพันธ์ของเบนซินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นหลัก สารฟีนอลิกพื้นฐานมีหมู่ฟีนอล (Phenol group) เป็นหลัก ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และมีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ (นิธิยา, 2548) จากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มฟีนอลิกจะขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล คุณสมบัติในการดึงอิเล็กตรอนของหมู่คาร์บอกซิลิกในกรดเบนโซอิก จะส่งผลให้ความสามารถในการให้ไฮโดรเจนของ Hydroxybenzoate น้อยลง สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส (Khezeri et al, 2006)

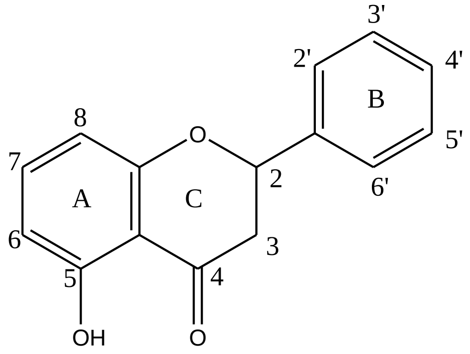


รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก

2.2.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid compound)

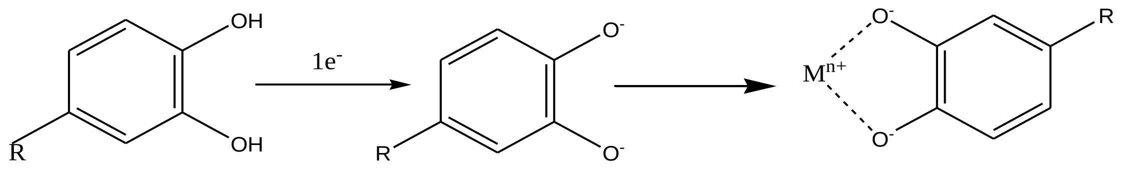
สารประกอบฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นแบบไดฟีนิลโพรเพน (Diphenylpropane : C_6-C_3-C_6) ประกอบด้วยวงแหวน 2 วงที่เชื่อมต่อกันด้วยคาร์บอนสามอะตอมซึ่งมักจะอยู่ในลักษณะของออกวีจีเนท เฮทเอทโรไซคลิก (Oxygenate heterocyclic) ดัง**รูปที่ 2.2** สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ประกอบด้วยหมู่ซุปเปอร์ออกไซด์และหมู่ไฮดรอกซิล ที่สามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ต่าง ๆ อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระที่ได้มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) อีกทั้งพบว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา และต้านไวรัส (Khezri et al, 2006) ซึ่งฟลาโวนอยด์นั้นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าชนิดอื่นแต่ก็ต้องขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นด้วย คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันของฟลาโวนอยด์ คือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงรวมทั้งคุณสมบัติในการช่วยลดการอักเสบ การยับยั้งเอนไซม์ การต้านอนุมูลอิสระ การบำรุงหลอดเลือด และการยับยั้งการเกิดเนื้องอก (Cushnie and Andrew, 2005) ฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลจะเป็นตัวไปชะลอ หรือยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอล LDL (Low density lipoprotein) ซึ่งกระบวนการออกซิเดชันเพื่อสลายคอเลสเตอรอล LDL นั้นจะทำให้เกิดการแข็งตัวของเกล็ดเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดหัวใจ เพราะฉะนั้นสารพวกฟลาโวนอยด์จึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพ คือ ช่วยป้องกันไขมันจับกับหลอดเลือด ป้องกันกระบวนการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอล LDL และช่วยลดความดันโลหิต ซึ่งปัจจัยที่ส่งเสริมคุณสมบัติดังกล่าวคือตำแหน่งและจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลและโครงสร้างอื่น ๆ ของโมเลกุล ตัวอย่างเช่น หมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวน B ซึ่งถือเป็นปัจจัยหลักที่ใช้ในการพิจารณาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ในกรณีของฟลาโวนอยด์นั้นพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง para (C4´) จะมีผลให้มีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันมากกว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง ortho (C2´ และ C6´) ในขณะที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง meta จะไม่มีผลต่อสมบัติดังกล่าว นอกจากนี้หมู่ไฮดรอกซิลที่ C3 (วงแหวน A) และ 4-keto group (C=O ที่คาร์บอนตัวที่ 4 (วงแหวน C) และ / หรือหมู่ไฮดรอกซิลที่ C5 (วงแหวน A) และ 4-keto group ในโมเลกุลของฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มที่ไวต่อการทำปฏิกิริยากับโลหะซึ่งเป็นการช่วยลดการเกิดออกซิเดชันได้อีกทางหนึ่ง โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน สำหรับกลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (เจนจิรา และประสงค์, 2554) แสดงดัง**รูปที่ 2.3** ส่วนหมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวน A ที่ตำแหน่ง meta

(C5 และ C7) และหมู่ไฮดรอซิลที่ตำแหน่ง C3 และพันธะคู่ระหว่าง C2 และ C3 ในวงแหวน C อาจมีผลเล็กน้อยต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์ (วิวัฒน์, 2545) โดยในงานวิจัยของ mouhoubi-Tafinine และคณะในปี ค.ศ.2016 ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบางส่วนของน้ำผึ้งแอลจีเรียและพรอพอลิส โดยกล่าวว่าในพรอพอลิสจะมีสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์แต่ส่วนใหญ่จะเป็นฟลาโวนอยด์และได้ทำการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกในพรอพอลิส พบว่าในตัวทำละลาย 85% เอทานอล จะพบสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในพรอพอลิส 5,351.22 mg/100g โดยใช้วัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ได้ทำการทดสอบสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในพรอพอลิส โดยการนำไปสกัดพรอพอลิสในเมทานอล 50% และเอทานอล 85% พบว่าสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเมทานอล 50% จะมีสารประกอบฟลาโวนอยด์อยู่ 124.76 mg/100g และในสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอล 85% จะมีฟลาโวนอยด์อยู่ 4,946.53 mg/100g ซึ่งจะใช้เทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และในงานวิจัยของ Seguen และคณะในปี ค.ศ. 2016 ได้ทำการตรวจสอบพรอพอลิสที่เก็บได้จากเมือง JiJel ซึ่งตั้งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศแอลจีเรีย พบว่ามีฟลาโวนอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ 1) Pectolinarigenin, 2) Pilosin, 3) ladanein, 4) Chrysin และ 5) Apigenin โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีเพื่อวิเคราะห์โครงสร้าง ซึ่งประกอบไปด้วย เทคนิค mass สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และ 1D, 2D NMR



Flavonoids

รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์

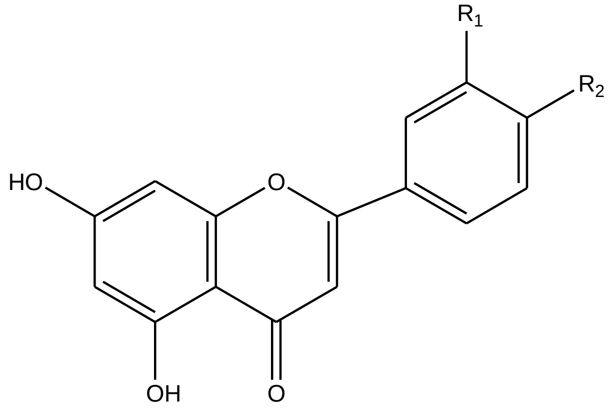


รูปที่ 2.3 กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์

2.2.3 ประเภทของสารประกอบฟลาโวนอยด์

2.2.3.1 ฟลาโวน (Flavone)

เป็นสารประกอบไม่มีสี ตัวอย่างเช่นอะจิพินิน (Agipinin) ลูเตโอลีน (Luteoline) และไตรซีตีน (Tricetin) (นิธิยา, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Kosalec et al., 2004) ที่พบว่าฟลาวาโนนเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ประเภทหนึ่งที่มีอยู่ในพรอพอลิส

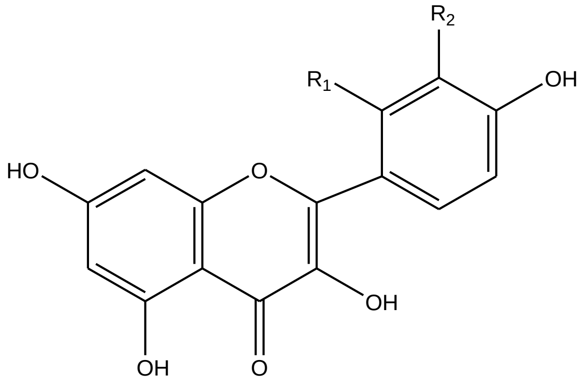


Flavones

รูปที่ 2.4 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวน

2.2.3.2 **ฟลาโวนอล (Flavonol)**

เกิดจากสารประกอบฟลาโวนมีการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 3 ตัวอย่างของฟลาโวนอล ได้แก่ เคอร์ซีติน (Quercetin) แคมพ์เฟอรอล (Kaempferol) และไมริซีติน (Myricetin) อะไกลโคน (Aglycone) ที่เป็นอนุพันธ์ของฟลาโวน และฟลาโวนอลที่ทราบโครงสร้าง มีอีกประมาณ 60 ชนิด ซึ่งแตกต่างกันที่หมู่ไฮดรอกซี และหมู่เมทอกซี (นิธิยา, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Kosalec et al, 2004) ที่พบว่าฟลาโวนอลเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ประเภทหนึ่งที่มีอยู่ในพรอพอลิส

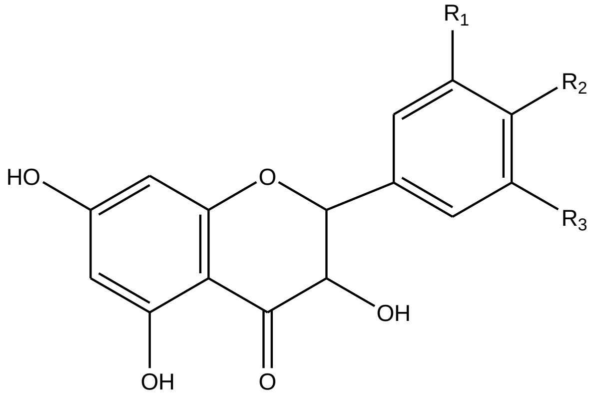


Flavonols

รูปที่ 2.5 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอล

2.2.3.3 **ฟลาวาโนนอล (Flavanonols)**

มีสูตรโครงสร้างคล้ายฟลาวาโนน แต่หมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่งที่ 3 (นิธิยา, 2548)



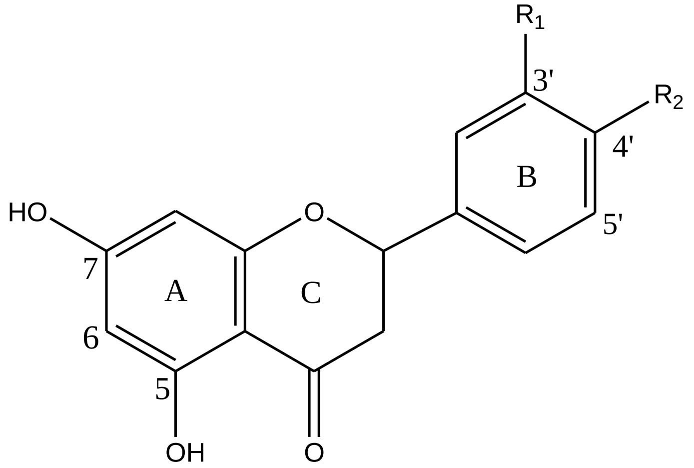
Flavanonols

รูปที่ 2.6 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาวาโนนอล

2.2.3.4 **ฟลาวาโนน (Flavanone)**

มีสูตรโครงสร้างคล้ายฟลาโวน แต่พันธะระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 เป็นพันธะเดี่ยว เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในผลไม้ตระกูลส้ม ตัวอย่างไกลโคไซต์ เช่น เฮสเพอริดีน (Hesperidin) และนารินจิน (Naringin) ที่พีเอชเป็นด่าง วงแหวนที่อยู่ภายในโมเลกุลของเฮสเพอริดีนจะเปิดออกได้เป็นชาลโคน (Chalcone) เหมือนการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ชาลโคนจะให้สีเหลืองถึงน้ำตาล (นิธิยา, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Kosalec et al, 2004) ที่พบว่าฟลาวาโนน เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ประเภทหนึ่งที่มีอยู่ในพรอพอลิส โดยมีงานวิจัยของ ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย และคณะในปี ค.ศ. 2013 ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสในประเทศไทย

ซึ่งเป็นการศึกษาทางพฤกษเคมีในองค์ประกอบของพรอพอลิสในประเทศไทยนำไปสู่การแยกฟีนิลแอลลิลฟลาวาโนนชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ (7”5)-8-[1-(4´-hydroxy-3´-methoxyphenyl)prop-2-en-1-yl]-(25)-pinocembrin โดยใช้เมทานอลในการสกัด และตรวจสอบโครงสร้างของสารเหล่านี้ด้วยเครื่อง NMR นอกจากนี้พบสารประกอบอีก 19 ชนิดที่ถูกแยกและยืนยันได้ว่าเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกเอสเทอร์



Flavanones

รูปที่ 2.7 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาวาโนน

2.3 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.3.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (ดังสมการ 2.1 และ 2.2) และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างได้ทันทีที่ถูกสร้างขึ้น มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือมีความเสถียร (พรทิพย์, 2011)

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \quad (1)$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \quad (2)$$

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย โดยมีตัวกระตุ้นสำคัญที่เรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) หมายถึง โมเลกุลที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่ใช่อนุมูลอิสระก็ได้ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระและ ROS เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์

(Superoxide anion radical), อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical), อนุมูลเปอร์ออกไซด์ (Peroxide radical), อนุมูลเปอร์ออกซิล (Peroxyl radical), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide), โอโซน (Ozone), ออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (Singlet oxygen), และอนุมูลไฮโดรเจน (Hydrogen radical) เป็นต้น (Malaisree et al., 2006) อนุมูลอิสระเหล่านี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (Ames et al., 1993) ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคพาร์กินสัน โรคสมองฝ่อ โรคไขข้ออักเสบ โรคหัวใจ และโรคที่เกิดจากเซลล์ละเนื้อเยื่อในร่างกายต่อต้านกันเอง (autoimmune) (Rangkadilok et al., 2007) นอกจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการแมทาบอลิซึมของเซลล์ ยังเกิดจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ มลพิษ การติดเชื้อโรค รังสียูวี ควันจากท่อไอเสียและควันบุหรี่ อนุมูลเหล่านี้สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระแล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้วงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่หยุดลง

2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

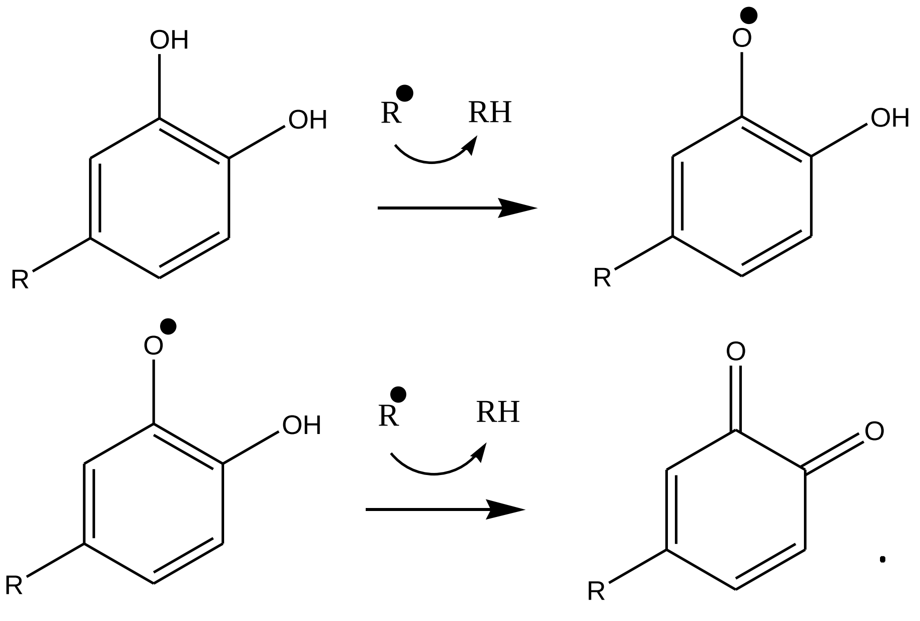
สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) โดยสารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น การจับกับอนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้าง หรือเข้าจับโลหะ (Sies, 1992) ในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระประกอบด้วย สารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน ซึ่งกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายกลไก เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) เป็นการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelatin) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (เจนจิรา และคณะ, 2554)

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเกิดเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สาร propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, (butylated hydroxytoluene, BHT และ tertiary butylhydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ใน

อุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิต ทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้ง วิตามิน เอนม์ และสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี และกลูต้าไธโอน สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ และ ubiquinones สามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (สุพิศรา, 2550)

2.3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลรวม

สารจำพวกฟีนอล (phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืชตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ สารจำพวก flavonoids ที่มี catechol เป็นองค์ประกอบ stilbenes, tannins ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group โดยมากเป็นสารที่มี ขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวก alcohol ได้ดี กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงใน (รูปที่1) คือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไป แต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป

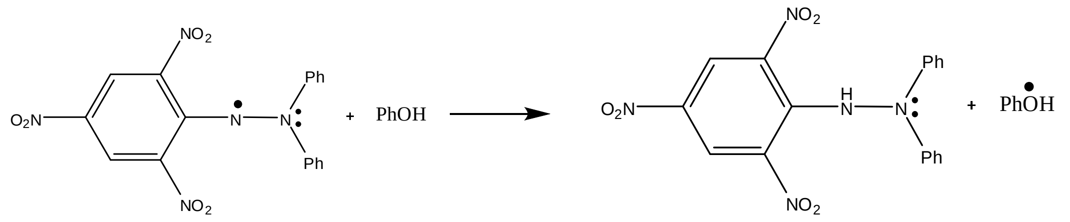


รูปที่ 2.8 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอล

สำหรับกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล (รูปที่ 2.9) เกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล โดยที่อนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายจะ

มีสีม่วง เมื่อสารจำพวกฟีนอลให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระต่อไป ซึ่งจะเห็นเป็นสีเหลืองนวล (ขั้นที่ 1) ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกันทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหมดไป (ขั้นที่ 2)

ขั้นที่ 1



DPPH (purple) Phenolic compound DPPH (yellow) Phenolic compound

ขั้นที่ 2

Phenoxy radical Phenoxy radical Phenolic compound

รูปที่ 2.9 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล

เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูอิสระที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ BHT ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า % inhibition โดยงานวิจัยของ Mot และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ได้ศึกษาการประเมินผลที่มีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพอลิสโดยใช้วิธี DPPH และข้อมูลจากเครื่อง FT-IR และ UV-vis สเปกโทรสโกปี ซึ่งอธิบายความแตกต่างสเปกตรัมของ FT-IR ของสารสกัดพรอพอลิสที่สามารถมองเห็นได้ใน 1100-1800 Cm^{-1} และการดูดกลืนของ IR ขึ้นอยู่กับกลุ่มฟังก์ชัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับข้อมูลใน IR ที่รวบรวมสารสกัดอื่นๆ จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และค่าการดูดกลืนสเปกตรัมของ UV-Vis ของสารสกัดพรอพอลิสมีวัสดุเฉื่อยที่ไม่สามารถสกัดเข้าไปในตัวทำละลายได้ สเปกตรัมยูวีของสารสกัดเอทานอลมีความคล้ายคลึงกับสเปกตรัมของสารประกอบฟีนอลิกทั่วไป โดยคุณสมบัติหลักของสเปกตรัมเหล่านี้เป็นวงกว้างที่ความยาวคลื่น 280-330 นาโนเมตร และความสัมพันธ์ที่ดีที่สุดระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับการดูดกลืนของแสง ของ

สเปกตรัม UV-Vis คือ พบได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 353 นาโนเมตร และจากงานวิจัยของ ภัทราพร ผูกคล้าย และ ธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด ในปี พ.ศ. 2553 ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH พบว่าฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระสามารถวัดการยับยั้งได้ในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-400 µg/mL โดยยับยั้งได้ 4.20% ของความเข้มข้น 10 µg/mL และยับยั้งได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 400 µg/mL แต่ก็ยังมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐาน 1 mM Ascorbic acid ซึ่งจะใช้เทคนิคการวัดการลดลงของสีด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

2.4 วิธีการสกัด

การสกัดจึงเป็นวิธีการอย่างหนึ่งที่ให้สารสำคัญจากพืชสมุนไพรซึ่งอาจทำได้หลายวิธีขึ้นกับชนิดหรือประเภทสารคุณสมบัติของสาร ความคงตัวของสารต่อความร้อนและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ด้วยวิธีหลักที่ใช้ในการสกัดพืชสมุนไพร ได้แก่

การแช่ (Percolation) คือกระบวนการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรโดยปล่อยให้สารละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้า ๆ พร้อมกับละลายองค์ประกอบจากผงสมุนไพรออกมาวิธีการ Percolation คือบรรจุผงสมุนไพรที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำยาสกัดใน Percolation ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงกระบอกปลายเปิดทั้งสองด้านโดยที่ปลายบนจะกว้างกว่าปลายล่างเพื่อสะดวกในการบรรจุผงสมุนไพรส่วนปลายล่างมักจะต่อกับท่อสายยางปิด-เปิดได้เพื่อที่ได้เป็นระยะเวลาพอสมควรแล้วจึงปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วพอเหมาะพร้อมกับเติมน้ำยาสกัดใหม่ผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วพอเหมาะพร้อมกับเติมน้ำยาสกัดใหม่ลงเรื่อยจนองค์ประกอบที่ต้องการในผงสมุนไพรละลายออกมาจนหมดโดยการตรวจสอบจากสารสกัดสุดท้าย

การหมัก (Maceration) คือกระบวนการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรโดยการแช่ผงสมุนไพรในน้ำยาสกัดจนกระทั่งน้ำยาสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้วิธีการทำ Maceration คือการแช่ผงสมุนไพรในน้ำยาสกัดที่เหมาะสมเป็นเวลา 2-4 วันหรือตามกำหนดในเภสัชตำรับหรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการออกมาหมดหลังจากนั้นจึงกรองแยกกากสมุนไพรออกจากน้ำยาสกัดและปรับปริมาตรสารสกัดตามต้องการ

การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) คือกระบวนการสกัดองค์ประกอบจาสมุนไพรในทำนองเดียวกันกับ Percolation แตกต่างกันที่ว่าขบวนการนี้จะต้องใช้ความร้อนเข้าช่วยและใช้เครื่องมือที่เป็นระบบปิดเรียกว่า soxhlet extractor โดยที่เมื่อน้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรที่บรรจุอยู่ในเครื่องได้ extraction แล้วมารวมกันในขวดแก้วที่ได้รับความร้อนจนสารละลายระเหยขึ้นไปและ

ควบแน่นตกลงมาผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกจนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมาหมด (อุดมเดชา, 2556)

2.4.1 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วสารสกัดที่ได้มักจะเจือจางทำให้นำไปใช้ประโยชน์ได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพจึงจำเป็นจะต้องนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นเสียก่อน ซึ่งทำได้หลายวิธีได้แก่

1) การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuum)

จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (Rotary evaporator) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่กลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser)และภาชนะรองรับสารละลายหลังกลั่น (receiving flask)โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออังน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้ต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสูญญากาศสารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ได้

2) การระเหย (free evaporation)

เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัด โดยใช้ความร้อนจากหม้อไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในสารสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่ายนอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญเมื่อใช้ความร้อน

3) การทำให้แห้ง (Drying)

เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophillizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dryer)

4) อัลตราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration)

เป็นการทำการสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรม (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

โดยทั่วไปแล้ว การสกัดเพื่อทำเป็นสารสกัดของพืชนั้นอาจทำได้ทั้งพืชที่แห้งแล้วหรือยังสดอยู่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่มีอยู่ในสารสกัดของพืชนั้นๆ สำหรับสารที่มีความเป็นขั้ว (polarity) น้อย เมื่อเทียบกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยทั่วไปแล้ว และเป็นสารที่มักจะสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) เฮกเซน (hexane) หรือปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) มักจะสกัดจากพืชที่ทำให้แห้งแล้วหรือที่ยังสดอยู่ก็ได้ แล้วแต่ละกรณีและยังขึ้นอยู่กับสารที่มีอยู่ในสารสกัดที่มีอยู่มีเสถียรภาพมากน้อยเพียงใด สารบางชนิดเมื่อทำให้แห้งไม่ว่าจะโดยการใช้ความร้อนหรือโดยการตากแดดหรือแม้แต่ตากให้แห้งในร่ม ก็สามารถเกิดความเสื่อมสลาย (decomposition) ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องรีบนำมาสกัดขณะที่พืชยังสดอยู่ ในการสกัดนั้นถ้าใช้วิธีการสกัดเย็น (cold extraction) คือแช่ด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง หรือโดยการสกัดร้อน (hot extraction) คือใช้ Soxhlet extraction apparatus หรือโดยการต้มกับพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับวิธีการใดจะเหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารที่มีอยู่ เช่น หากสารนั้นสกัดออกมาได้ง่ายโดยตัวทำละลายชนิดหนึ่งหรือไม่เสถียรต่อความร้อน จะเลือกใช้วิธีการสกัดเย็น เพราะเป็นวิธีที่ง่ายที่และสะดวกและทำให้สารเกิดการเสื่อมสลายน้อย

2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2.5.1 โครมาโทกราฟี (Chromatography)

เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันที่ได้ผลดีมากและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความแตกต่างการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งอาจเป็นของเหลวหรืออาจเป็นแก๊ส กับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) หรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง ซึ่งทา หน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่

ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี คือ

1) ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม
2) ตรวจความสม่ำเสมอของสารตัวอย่าง
3) ทำสารให้บริสุทธิ์
4) ตรวจเอกลักษณ์ของสาร
5) ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ
6) ตรวจสารปนเปื้อน

2.5.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจการดาเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่าง ๆ ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจานวนองค์ประกอบในของผสม

หลักการของ TLC นั้น คล้ายคลึงกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี จะต่างกันก็เพียงแต่ในกรณีของ TLC วัฏภาคนิ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก แผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกบาง ๆ สารจะถูกแต้มไว้ที่ใกล้ ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปว่างลงในภาชนะที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตื้น ๆ เมื่อตัวทาละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้นด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้น้อยจึงเคลื่อนที่ไปได้ดีด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัฏภาคนิ่งได้ดี

เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบดังในกรณีของคอลัมน์โครมาโตกราฟี ประโยชน์ของ TLC นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังรวมถึงการใช้ในการทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (โดยการใช้วัฏภาคนิ่งชนิดเดียวกับที่จะบรรจุลงคอลัมน์ในการทำ TLC) รวมถึงการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย

ตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค TLC ได้แก่ อะลูมินา และซิลิกาเจล เช่นเดียวกับที่ใช้ในการทาคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังนั้นระบบตัวทาละลายรวมถึงความเร็วช้าของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้วและไม่มีขั้วจึงมีแนวโน้มทานองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยทั่ว ๆ ไปแล้วนิยมใช้ตัวดูดซับเป็นอะลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย ๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิแฮไลด์ อีเทอร์ และนิยมใช้ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น

2.5.3 ขั้นตอนการทำ TLC

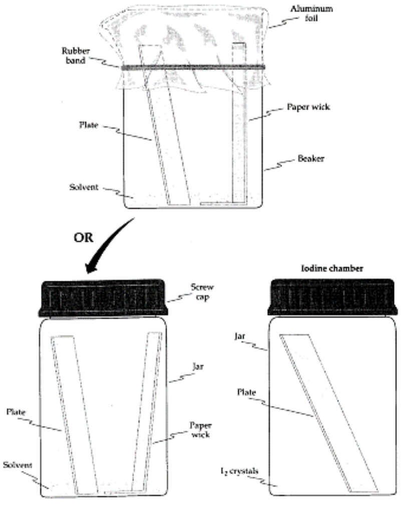
การทำ TLC ต้องเริ่มด้วยการเตรียมแผ่นที่มีวัฏภาคนิ่งเคลือบอยู่ โดยทั่วไปสามารถทำได้เองโดยจุ่มแผ่นกระจก (ขนาดประมาณแผ่นสไลด์ที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์) ที่สะอาดลงในสารแขวนลอยที่ข้นเหลว (slurry) ของสารที่เป็นวัฏภาคนิ่งในตัวทาละลายที่เหมาะสม ยกขึ้นมาให้ได้การเคลือบที่สม่าเสมอแล้วทิ้งให้แห้ง ในปัจจุบันมีการทาแผ่นทินแลร์สาเร็จรูปซึ่งเคลือบวัฏภาคนิ่งไว้บนแผ่น

อะลูมิเนียมบาง ๆ จำหน่าย โดยมักผสมสารเรืองแสง เช่น ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS) ไว้ด้วย ซึ่งจะทาให้สามารถสังเกตตำแหน่งของสารโดยใช้แสง UV ได้สะดวก

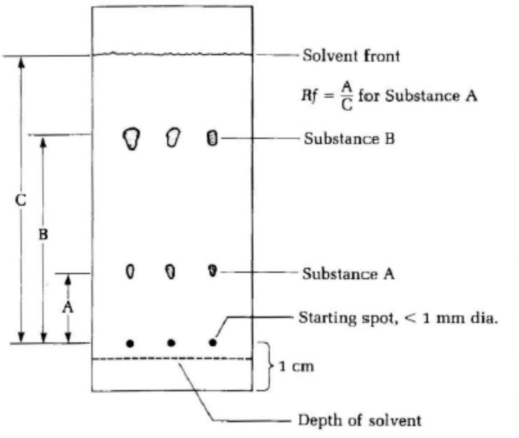
2.5.4 การเตรียมสารตัวอย่าง

ควรเตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 1% แม้ว่าตัวอย่างนั้นจะเป็นของเหลวอยู่แล้วก็ตาม แล้วแต้ม (spotting) ลงบนแผ่นทินเลเยอร์ ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 cm นำแผ่นดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ ที่มีตัวทำละลายใส่ไว้เพียงเล็กน้อยโดยให้ระดับตัวทำละลายสูงไม่เกินระดับที่แต้มสารตัวอย่าง (อย่าให้ท่วมจุดสารตัวอย่าง) และอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย (ซึ่งต้องเตรียมไว้ก่อนหน้านี้โดยใช้กระดาษกรองบุไว้ที่ผนังด้านในของบีกเกอร์ แล้วปิดด้วยกระจกนาฬิกา) **รูปที่ 2.10** คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC ขอบของรอยเปียกของตัวทำละลายนี้เรียกว่า solvent front เมื่อมาเกือบถึงปลายด้านบนของแผ่น (ห่างจากปลายบนลงมา 0.5-1 cm) ก็ให้รีบเอาแผ่นออก ใช้ดินสอขีดบ่งรอย solvent front ไว้เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f (retention factor) ต่อไป ระหว่างที่รอต้องแน่ใจว่าแผ่น TLC อยู่ในระบบปิดตลอดเวลา

ค่า R_f นี้เป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทาการแต้ม ไปถึงตำแหน่งสุดท้ายของมัน เทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทาละลายเคลื่อนที่ (จาก spotting ถึง solvent front) เนื่องจากสารต่างชนิดกันจะถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้ไม่เท่ากัน จึงถูกตัวทาละลายพาขึ้นมาสูงได้ไม่เท่ากัน การแยกจึงเกิดขึ้น ค่า R_f ของสารแต่ละชนิด ในวัฏภาคนิ่ง และวัฏภาคเคลื่อนที่หนึ่ง ๆ จะเป็นค่าคงที่ และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดูรูปและตัวอย่างการคำนวณ R_f ใน**รูปที่ 2.11**



รูปที่ 2.10 การวางแผ่น TLC ที่แต้มสารแล้วลงในบีกเกอร์หรือขวดที่บรรจุตัวทำละลาย และการนำแผ่น TLC ที่ทำโครมาโตกราฟีเสร็จแล้วไปอังไอระเหิดของไอโอดีน



รูปที่ 2.11 ตำแหน่งการแต้มสาร ระดับตัวทำละลาย solvent front ในการทำ TLC และการคำนวณ R_f

2.5.5 การคำนวณหาค่า R_f

ค่าR_f เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่างๆ (ตัวดูดซับ , ตัวทำละลาย และความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด ค่านี้แปรเปลี่ยนได้ถ้าสภาวะในการทดลองเปลี่ยน ค่า R_f ถูกนิยามไว้ดังนี้ :

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ในการพิสูจน์ว่าสารในการทดสอบเป็นตัวเดียวกันหรือไม่โดยการเปรียบเทียบค่า R_f ระหว่างสาร ควรใช้ ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบโดยการใช้ตัวทำละลายหลายๆ ระบบนั้น สารประกอบต่างชนิดกันอาจได้ค่า R_f เหมือนกันในตัวทำละลายหนึ่ง แต่จะมี R_f ที่แตกต่างกันในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งแน่นอน

ในกรณีที่องค์ประกอบในสารตัวอย่างมีสีทุกองค์ประกอบจะสามารถเห็นจุดของแต่ละองค์ประกอบที่เคลื่อนที่ไปได้ แต่ก็มีสารจำนวนมากที่ไม่ให้สี โดยทั่วไปสารอินทรีย์ทั้งหลายที่ถูกดูดซับอยู่บนแผ่นทินเลเยอร์ จะให้จุดสีได้เมื่อนำแผ่น TLC ไปว่างในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีนอยู่ 2-3 เกล็ด ทั้งนี้เนื่องจากไอของไอโอดีนจะถูกดูดซับโดยจุดของสารเกิดเป็นสีม่วงน้ำตาลขึ้น ซึ่งผู้ทดลองต้องรีบใช้ดินสอวงไว้ทั้งนี้เพราะสีจะจางลงเรื่อย ๆ

อีกวิธีหนึ่ง ในการหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสีก็คือ การใช้แผ่น TLC สำเร็จรูป ที่มีการผสม fluorescent indicator (ซิงค์ซัลไฟด์) อยู่กับซิลิกาเจลที่ฉาบไว้บาง ๆ ซึ่งจะทำให้แผ่น TLC เรืองแสงได้เมื่อส่องด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่นเหมาะสม เมื่อทำการแยกแล้วให้นำแผ่น TLC มา

ส่องกับแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หากสารที่จะวิเคราะห์มีสมบัติเป็นตัวเควนช์ (quencher) จะเห็นจุดสารดูดกลืนแสงยูวีเป็นสีม่วง สารที่มีสมบัติดังกล่าวได้แก่สารที่มีโครโมฟอร์ เช่น double bond หรือ aromatic ring จึงจะใช้การตรวจสอบแบบนี้ได้ แผ่น TLC สาเร็จรูป ดังกล่าวนี้สามารถนามาใช้ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี รวมทั้งตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารในกระบวนการแยกได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม แผ่น TLC สำเร็จรูปดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพงจึงควรใช้อย่างประหยัด (ศุภศร และคณะ, 2015)

2.6 การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer

เป็นเครื่องมือที่นำเทคนิค UV-vis spectroscopy ไปใช้งาน เครื่องมือตัวนี้ทำหน้าที่ในการตรวจวัด ความ เข้ม แสงที่ผ่านหรือสะท้อนจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับความเข้มแสงจาก แหล่งกำเนิด เครื่อง UV-vis spectrophotometer โดยทั่วไปแล้วจะ มีส่วน ประกอบหลัก ๆ ที่เหมือนกัน ได้แก่แหล่งกำเนิดแสง เกรตติ้งหรือ โมโนโครเมเตอร์ เซลล์ที่บรรจุ สารตัวอย่าง และเครื่องตรวจ วัด แหล่งกำเนิดแสง จะต้องให้แสงที่คงที่อย่างต่อเนื่อง ตัวที่นิยมใช้ คือ หลอดทังสเตนฮาโลเจน ซึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 320-2,500 นาโนเมตร สำหรับ แหล่ง กำเนิดแสงในช่วงรังสียูวีนั้นจะใช้หลอดไฮโดรเจนหรือหลอด ดิวทีเรียม ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 160-375 นาโนเมตร แต่แสงที่ได้จาก แหล่งกำเนิดนั้นจะมีความยาวคลื่นต่างๆ ดังนั้นจึงต้องใช้ โมโนโครเมเตอร์ เป็นตัวกระจายแสงออกเพื่อให้แสงที่จะผ่านไปยังตัวอย่างมีความยาวคลื่นค่า เดียวตาม ที่ต้องการหลังจากนั้นแสงความยาวคลื่นค่าเดียวจะผ่านไปยังเซลล์ที่ บรรจุสารตัวอย่าง และ สารเปรียบเทียบ (cuvettes) ซึ่งมีรูปร่างต่าง ๆ กัน ออกไป แต่โดยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นกล่องทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีความกว้าง ภายใน 1 เซนติเมตร (ซึ่งค่านี้จะเป็นค่าระยะทางเดินของแสงที่ผ่านเข้าไปใน ตัวอย่างตาม กฎของ Beer-Lambert) เครื่อง UV-vis spectrophotometer บางรุ่น สามารถใช้ หลอดทดลองเป็น cuvettes ได้ แต่ cuvettes ที่ดีที่สุดนั้น ทำมาจากควอร์ตที่มีคุณภาพสูง สำหรับ cuvettes ที่ทำจากแก้วหรือพลาสติกนั้น ก็เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป แต่สามารถใช้ได้เฉพาะในช่วงแสงขาวเท่านั้น เพราะ แก้ว และพลาสติกดูดกลืนแสงในช่วงรังสียูวีแสงในส่วนที่ ไม่ถูกดูดกลืน จะเดิน ทางผ่านตัวอย่างมาถึงเครื่องตรวจวัด สำหรับเครื่อง ตรวจวัดที่นิยมใช้ ได้แก่ PMT (photomultiplier tube), diode arrays และ CCDs (charge coupled devices) เครื่องจะทำการบันทึกค่าความยาวคลื่น ร่วมกับค่ามุมของ แต่ละความยาวคลื่น ที่เกิดการดูดกลืน ผลของสเปคตรัมที่ได้ จะแสดงในรูป ของกราฟระหว่างค่า absorbance และค่าความยาวคลื่น

เครื่อง UV-vis spectrophotometer สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ แบบลำแสงเดี่ยว และแบบลำแสงคู่ สำหรับเครื่องแบบ ลำแสงเดี่ยว เป็นเครื่องที่ใช้ ลำแสงเดียว จากแหล่งกำเนิด ผ่านไปยังตัวอย่าง เครื่องมือนี้ได้รับ การออกแบบ ให้สามารถ ใช้งานได้ง่ายสะดวก และมีราคาไม่แพงมากนัก

สำหรับเครื่องแบบลำแสงคู่นั้น แสงจะถูกแยกออกเป็น 2 ลำ ก่อนที่จะไปตก ลงบนตัวอย่าง โดยแสงลำหนึ่งจะใช้เป็นลำแสงอ้างอิง ขณะที่อีกลำจะผ่านไป ยังตัวอย่าง เครื่องมือที่เป็นแบบลำแสงคู่บางรุ่นจะมีเครื่องตรวจวัด 2 ตัว เพื่อที่ จะตรวจวัดแสงอ้างอิงและแสงที่มาจากตัวอย่างได้พร้อมกัน แต่ในบางรุ่น จะมี เครื่องตรวจวัดเพียงตัวเดียว โดยแสงทั้งสองลำจะผ่านตัว beam chopper ซึ่งจะทำหน้าที่กักแสงลำหนึ่งไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเครื่องตรวจวัดจึงสามารถ ตรวจวัดความแตกต่างของแสงทั้งสองลำได้

2.6.1 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-vis spectrophotometer

1) แหล่งกำเนิดแสง

แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วย หลอดกำเนิดแสง มีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืน

2) โมโนโครเมเตอร์

ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (prism) หรือ เกรตติ้ง (grating)

3) เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง

เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (cell sample) บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวตต์ (cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอตซ์ (quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

4) Detector

ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector) หลักการของเครื่อง UV-vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์

กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ (แม้น และคณะ, 2552)

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

พรอพอลิสของชันโรง (6.72481N, 101.624683E) ชื่อวิทยาศาสตร์: *Meliponini* จากพื้นที ป่าชุมชนปะเสยะวอ อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 เครื่องระเหยแห้ง ยี่ห้อ IKA รุ่น RV 10

3.2.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.4 เครื่อง Ultrasonicator แบบสั่นในน้ำ ยี่ห้อ Crest

3.2.5 กรวยกรองบุชเนอร์

3.2.6 UV-vis spectrophotometer ยี่ห้อ JASCO รุ่น V-730

3.2.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Balance)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร

3.3.2 หลอดทดลอง

3.3.3 ขวดปรับปริมาตรขนาด 10, 50 และ 100 มิลลิลิตร

3.3.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.3.5 ไมโครปิเปต

3.3.6 ทิปที่ใช้กับไมโครปิเปต

3.3.7 กระดาษกรอง ยี่ห้อ Whatman No. 1 และ No. 4

3.3.8 อะลูมิเนียมฟอยล์

3.3.9 แท่งแก้วคนสาร

3.3.10 ช้อนตักสาร

3.3.11 บีกเกอร์

3.3.12 ที่วางหลอดทดลอง

3.3.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4 สารเคมี

3.4.1 Hexane (C_6H_{14})

3.4.2 Dichloromethane (CH_2Cl_2)

3.4.3 Ethylacetate ($C_4H_8O_2$)

3.4.4 Ethanol (C_2H_6O)

3.4.5 Quercetin

3.4.6 Aluminium Chloride Anhydrous ($AlCl_3$)

3.4.7 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)

3.4.8 Methanol (CH_3OH)

3.4.9 L-ascorbic acid ($C_6H_8O_6$)

3.5 วิธีการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

นำพรอพอลิสน้ำหนัก 100 กรัม มาหุ้มด้วยผ้าขาวบางแล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ Hexane , Dichloromethane, Ethylacetate และ Ethanol ตามลำดับ ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (อัตราส่วนระหว่างพรอพอลิสและตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10)

⇩

สกัดด้วยเครื่อง Ultrasonicator เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนผสมของสารสกัดมากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

⇩

นำสารสกัดพรอพอลิสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

⇩

นำสารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายออกเก็บใส่ในขวด Vial แล้วเก็บไว้ให้พ้นแสงในเดซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนักและนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry

นำสารสกัดพรอพอลิสที่มีความเข้มข้น 100 μg/mL ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม 2% $AlCl_3$ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

⇩

นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร แล้วทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์เชิงปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin

⇩

ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณกับโปรแกรมเหมือนข้างต้น

3.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin

ชั่ง Quercetin 0.005 g ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย Ethanol แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 200 μg/mL

⇩

เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 μg/mL

⇩

นำสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม 2% $AlCl_3$ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

⇩

นำมาแสกนหาค่า λ_{max} จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อเป็นตัวเทียบของสารตัวอย่าง

3.8 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัดพรอพอลิส

นำพรอพอลิสมาสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง

↓

จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำสารสกัดพรอพอลิสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

↓

นำสารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายออกเก็บใส่ในขวด Vial แล้วเก็บไว้ให้พ้นแสงในเดซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

↓

นำสารสกัดพรอพอลิสวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry (ดังข้อ 3.6 และ 3.7) เพื่อศึกษาผลของการสกัดพรอพอลิสต่ออุณหภูมิ

3.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค Thin layer chromatography

นำสารสกัดในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด มาจุดลงบนแผ่น TLC plate ชนิด Silica gel 60 F_{254}

↓

จากนั้นนำแผ่น TLC ไปแช่ใน mobile phase ซึ่ง mobile phase ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate (70 : 30) และ Hexane : Ethyl acetate (90 : 10)

↓

ทำตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารด้วยการส่องภายใต้แสงยูวี แล้วทำเครื่องหมายตรง Solvent front

↓

คำนวณหาระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ คำนวณค่า Retention factor (R_f) ของสารสกัดแต่ละชนิด

3.6 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพรอพอลิสโดยใช้วิธี DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.2 mM และเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 µg/mL ในเมทานอล

↓

จากนั้นดูดสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตรละ 3 mL แล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 mL

↓

เขย่าแล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องยูวี ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก เป็นสารละลายมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

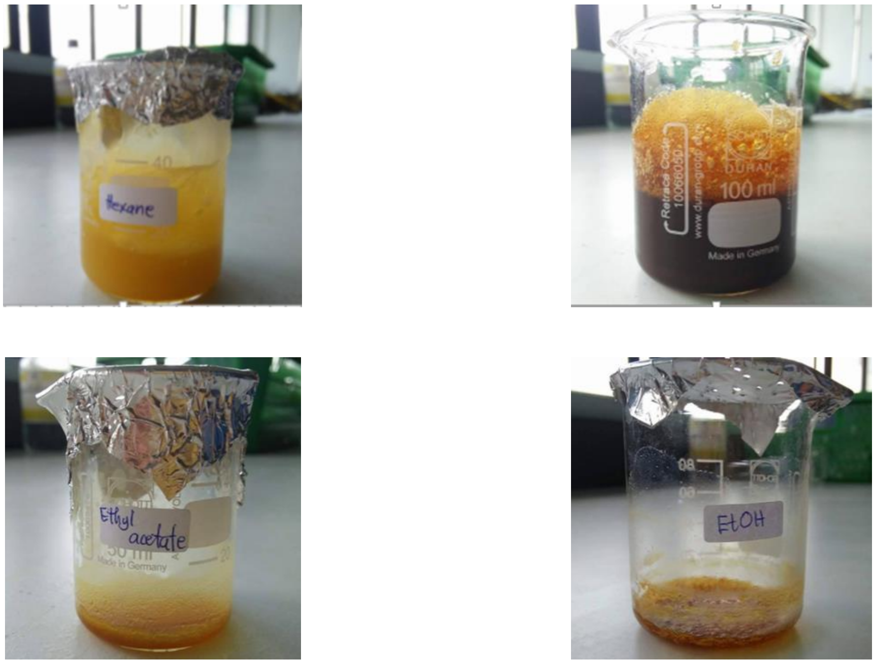
4.1 ลักษณะของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

พรอพอลิสที่ใช้ในการทดลองมาจากพื้นที่ ป่าชุมชนปะเสยะวอ อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี มีลักษณะเหนียวสีน้ำตาลไม่มีกลิ่น **(ดังภาพที่ 4.1)** ซึ่งเมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดด้วยการไล่ขั้วจากขั้วต่ำไปยังขั้วสูง จะได้สารละลายที่มีลักษณะที่แตกต่างกันและเมื่อนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Rotary Evaporator) จะได้สารเหนียวที่มีลักษณะของสีต่างกัน **(ดังภาพที่ 4.2)** แล้วนำมาชั่งน้ำหนักและคำนวณหาผลผลิตร้อยละของสารสกัดจะได้ผลผลิตร้อยละของสารสกัดในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด **(ดังตารางที่ 4.1)**

ตารางที่ 4.1 แสดงผลผลิตร้อยละของสารสกัดพรอพอลิส

ชนิดตัวทำละลายของสารสกัด	ผลผลิตร้อยละ (%w/w)
เฮกเซน	57.67
ไดคลอโรมีเทน	28.38
เอทอลอะซิเตด	0.86
เอทานอล	0.77

ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของพรอพอลิสจากรังชันโรง



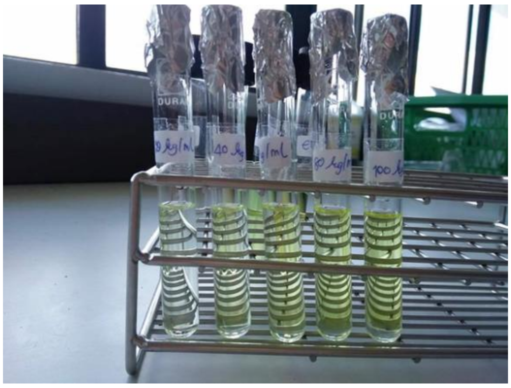
ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะของสารสกัดพรอพอลิสจากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด

4.2 ผลของอุณหภูมิและชนิดของตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัด

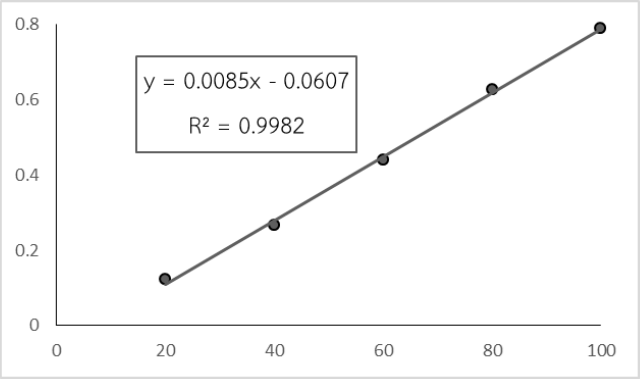
ซึ่งการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัดสารพรอพอลิสทำได้โดยการวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry โดยที่สารสกัดฟลาโวนอยด์เมื่อทำปฏิกิริยากับอะลูมิเนียมคลอไรด์จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Al—Flavonoids ซึ่งจะเกิดเป็นสารละลายสีเหลืองแกมเขียว **(ดังภาพที่ 4.3)** แล้วนำมาวัดด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน Quercetin วิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ **(ดังภาพที่ 4.4)** จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยสารสกัดพรอพอลิสที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด พบว่าในสารสกัดจากเอทานอลจะมีสารประกอบของฟลาโวนอยด์อยู่สูงที่สุด คือ 108.13 mg QE/g crude extract **(ดังตารางที่ 4.2)** ซึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณ ฟลาโวนอยด์นี้จะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่างด้วยเนื่องจากระบบของตัวทำละลายที่มีขั้วสูงจะสามารถสกัดปริมาณฟลาโวนอยด์ออกมาได้มากสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่าสารสกัดพรอพอลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะมีสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุด

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด

ชนิดตัวทำละลายของสารสกัดพรอพอลิส	**ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g crude extract)**
เฮกเซน	42.27
ไดคลอโรมีเทน	43.8
เอทิลอะซิเตด	96.57
เอทานอล	108.13



ภาพที่ 4.3 แสดงสีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารสกัด Flavonoid กับโลหะ Al



ภาพที่ 4.4 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin

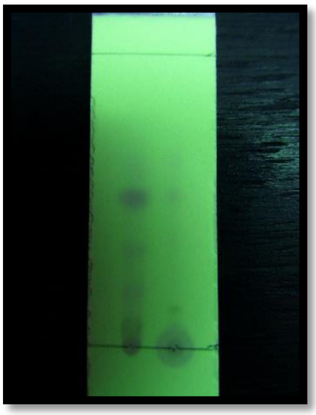
การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดฟลาโวนอยด์จากพรอพอลิส โดยได้ทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 40 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยการนำไปสกัดด้วยเทคนิคอัลตร้าโซนิคในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด แต่จะมีตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนชนิดเดียวที่สามารถศึกษาที่อุณหภูมิห้องเท่านั้นเนื่องจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีจุดเดือดต่ำ เมื่อนำไปสกัดที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียสทำให้ตัวทำละลายแห้งและส่งผลให้บีกเกอร์ร้าวและแตกได้ ซึ่งจะนำไปวัดหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry เช่นเดียวกับการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัดสารฟลาโวนอยด์ในพรอพอลิส ซึ่งพบปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดในสารสกัดหยาบเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและรองลงมาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่ที่พบน้อยที่สุดที่อุณหภูมิห้องของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน **(ดังตารางที่ 4.3)** ดังนั้นผลการศึกษาของอุณหภูมิต่อการสกัดสารพรอพอลิสได้ดีที่สุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสกัดฟลาโวนอยด์

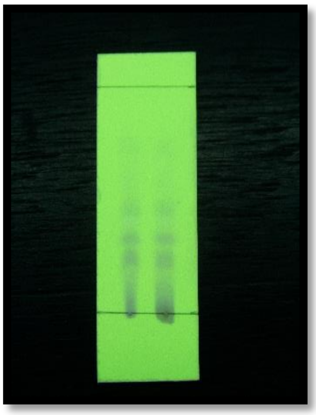
ชนิดตัวทำละลายของการสกัดสารหยาบ	**ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g crude extract)ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (องศาเซลเซียส)**		
	ห้อง	**40**	**60**
เฮกเซน	5.7	3.97	6.8
ไดคลอโรมีเทน	6.27	-	-
เอทิลอะซิเตด	9.1	11.9	7.93
เอทานอล	41.23	85.8	84.5

4.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์จากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด โดยการแยกด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีชนิด Silica gel 60 F_{254} ที่แช่ใน mobile phase ที่ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate (70 : 30) ของสารสกัดจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดและเอทานอล และ mobile phase ที่ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate (90 : 10) เป็นของสารสกัดจากตัวทำละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ซึ่งทำการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารภายใต้แสงยูวี แล้วทำเครื่องหมายตรง solvent front วัดค่าของสารเคลื่อนที่แล้วนำมาคำนวณค่า Retention factor (R_f) หรือระยะการเคลื่อนที่ของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายเอทานอลเกิดโครมาโทแกรม **(ดังภาพที่ 4.5)** โดยสารสกัดจากเฮกเซนเกิดการแยก 4 จุด ซึ่งมีค่า R_f จากจุดที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับดังนี้ 0.23, 0.31, 0.46 และ 0.74 สารสกัดจากไดคลอโรมีเทนเกิดการแยก 4 จุด ดังนี้ 0.23, 0.31, 0.43 และ 0.69 ซึ่งจากค่า R_f ของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดสามารถคาดการณ์ได้ว่าสารที่สามารถแยกได้อาจเป็นสารตัวเดียวกัน ส่วนสารสกัดจากเอทิลอะซิเตดสามารถแยกได้ถึง 5 จุด ดังนี้ 0.09, 0.17, 0.31, 0.48 และ 0.60 และสารสกัดจากเอทานอลสามารถแยกได้ 4 จุด ดังนี้ 0.14, 0.37, 0.51 และ 0.48



(1)

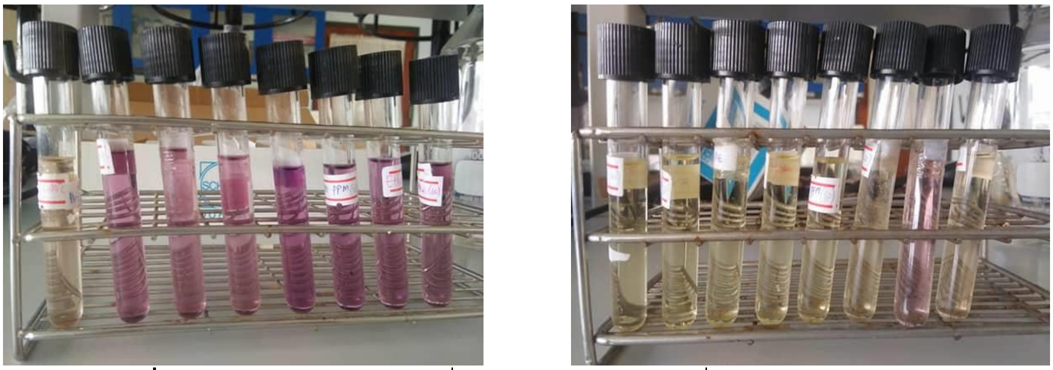


(2)

ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดพรอพอลิสในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด สารสกัดจากเอทิลอะซิเตดและเอทานอล (1), สารสกัดจากเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (2)

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl กับสารตัวอย่าง ซึ่งเกิดการเปลี่ยนของสีจากสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง **ดังภาพที่ 4.6** โดยจะอาศัยเทคนิค UV-visible วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหา % DPPH จากการศึกษาและคำนวณพบว่าสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1.562 µg/mL ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึง 83.287±6.72 % ดังแสดงใน **(ตารางที่ 4.4)**



ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะการเปลี่ยนสีของสารตัวอย่างเมื่อเติมสารละลาย DPPH

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า % DPPH radical inhibition ของสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (µg/mL)	**% DPPH radical inhibition**			**ค่าเฉลี่ย**	**± S.D.**
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**		
1.562	75.577	86.372	87.912	83.287	6.721
3.125	80.259	73.776	85.895	79.976	6.064
6.25	76.116	83.292	83.385	80.931	4.170
12.5	84.524	78.919	82.676	82.040	2.856
25	68.479	76.640	78.596	74.572	5.366
50	68.925	70.865	74.115	71.302	2.622
75	66.446	64.829	61.965	64.413	2.269
100	10.008	59.224	57.699	42.310	27.985

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

พรอพอลิสที่นำมาศึกษาหาตัวทำละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัดสารฟลาโวนอยด์ โดยทำการสกัดด้วยเทคนิคอัลตร้าโซนิคแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetry โดยใช้เทคนิค UV-visible spectrophotometry พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารฟลาโวนอยด์คือ ตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ 108.13 mg QE/g crude extract ส่วนอุณหภูมิที่สามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ได้ 85.8 mg QE/g crude extract จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่า สารที่แยกออกมาได้มีค่า R_f ใกล้เคียงกัน ซึ่งคาดการณ์ได้ว่าสารที่แยกออกมาได้อาจเป็นสารตัวเดียวกัน และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบฟลาโวนอยด์พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึง 83.287±6.72 %

บรรณานุกรม

จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า. (2008). องค์ประกอบทางเคมีแอกทิวิตีที่ต้านการแบ่งตัวและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยพรอพอลิสของชันโรง. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1(1) : 59-70.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2548). เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 428.

พรทิพย์ วิรัชวงศ์. (2011). อนุมูลอิสระ (free radical), สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants). ค้นเมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน 2560, จาก www.gpo.or.th,rdi/html/antioxidants.html

ภัทราพร ผูกคล้าย และ ธัญญูรัตน์ เชื้อสะอาด. (2553). การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส. รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, ยุวดี เชี่ยววัฒนา, อทิตยา ศิริภิญญานนท์, ศรีวิไล โอมอภิญญาณ และอุมาพร สุขม่วง. (2552). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด.

วิวัฒน์ หวังเจริญ. (2545). บทบาทของสารประกอบฟีนอลต่อสุขภาพ. อาหาร. **32**: 245-253.

วันเพ็ญ เจริญจิต. (2547). พรอพอลิสจากผึ้งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต้านโรค. ชมรมการจัดการทรัพยากรเกษตร. ค้นเมื่อ 19 กรกฎาคม 2559, จาก www. Matichon.co.th

ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง, ธีรยุทธ วิไลวัลย์, วรวีร์ โฮเว่น และ ภาณุวัฒน์ ผดุงรส. (2015). ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 1. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สรจักร ศิริบริรักษ์. (2547). พรอพอลิสคืออะไร. Herbs for Health แพรว รายปักษ์ ปีที่ 26, ฉบับที่ 602, ผู้เชี่ยวชาญเภสัชสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข.

สุพิศรา เตชะเปรมปรีชา. (2550). นานาสาระงานเคมีทำเนียบธุรกิจและผลิตภัณฑ์เคมี. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลนนทบุรี. บริษัทกระแสธุรกิจจำกัด. 72-74.

สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์, ชญาณี อ๊อดทรัพย์, ธัญญลักษณ์ ตะโกดี และ หนึ่งฤทัย วิชัยกุล. (2555). ความหลากหลายของผึ้งและชันโรงและการนำมาใช้ประโยชน์ของพรอพอลิสจากรังผึ้งและชันโรงในพื้นที่อพ.สช. รายงานวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555.

อัญชลี สาสดิ์ธรรม. (2556). มหัศจรรย์ชันโรง. พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท ทริปเพิ้ล กรุ๊ป จำกัด. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญญบุรี.

อุดมเดชา พลเยี่ยม. (2556). การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร. ค้นเมื่อ 3 พฤศจิกายน 2559, จาก https://repository.rmutp.ac.th//bitsream/handle

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proceeding of the national academy of sciences of the United states of America. **90**: 7915-7922.

Athikomkulchai, S., Awale, S., Ruangrangsi, N., Ruchirawat, S. and Kadota, S. 2013. Chemical constituents of Thai propolis. *Fitoterpia*. **88**: 96-100.

Cushnie, T. P. T. and Andrew, J. L. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Antimicrobial Agents*. **26**: 343-356.

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

Khezeri, M., Rostami, S., Riseh, R. s. and Alizadeh, A. 2006. Effect of propolis and Clotrimazole on Controling Aflatoxin in Pistachio *(Pistacia vera L.)*. *International journal of agriculture and Biology*. **8(5)**: 1560-8530.

Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepnjak, S. and Vladimir-Knezevic, S. 2004. Quantitative analysis of the Flavonoids in raw Propolis from northern Crotia. *Acta Pharmaceutica*. **54**: 65-72.

Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S. and Tamendjari, A. 2016. Antioxydant activity of some Algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*. 85-90.

Mot, A. C., Silanghi-Dumitrescu, R. And Sarbu, C. 2011. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profile, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *food composition and analysis*. 516-522.

Malaisaree, M., Srisomang, R. and Boonphong, S. 2006. Chemical constituents of *Lagerstroemia Loudonii* flower and their Antioxidant Activities. Naresuan University Science . **2(2)**: 231-240.

Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, C., Mahidol, C., Ruchirawat, M. and Satayavivad, J. 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized Longan fruit Extract. Food Chemistry Toxical. **45**: 328-336.

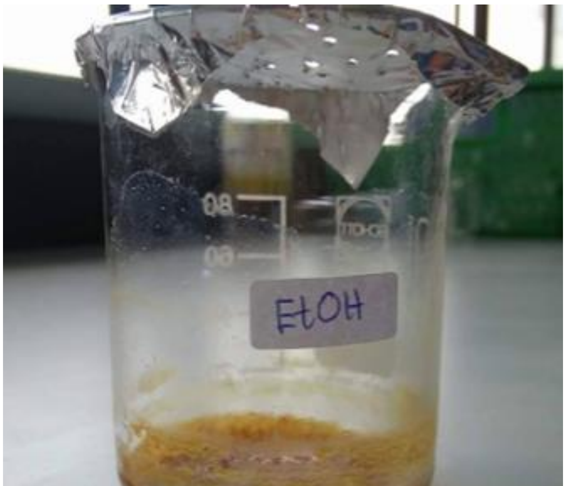
Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, Lahouel, F., Lahouel, M. and Rhouati, S. 2016. Flavonoid from Algerian propolis. *Arabian Journal of chemistry*. **9**: S425- S428.

Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. 1992. Antioxidant function of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene other Carotenoids. Annals of the NewYork academy of science .**368**: 7-19.

ภาคผนวก ก

ลักษณะพรอพอลิสและสารสกัดฟลาโวนอยด์

ภาพที่ 1 ตัวอย่างพรอพอลิสที่นำมาศึกษา

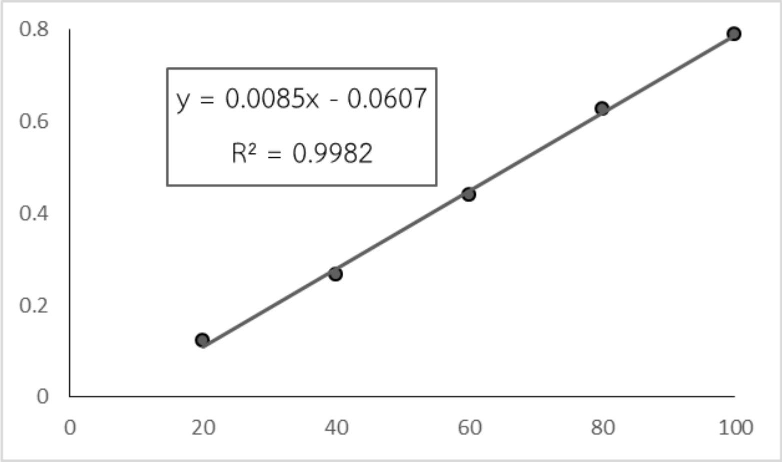


ภาพที่ 2 สารสกัดฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้

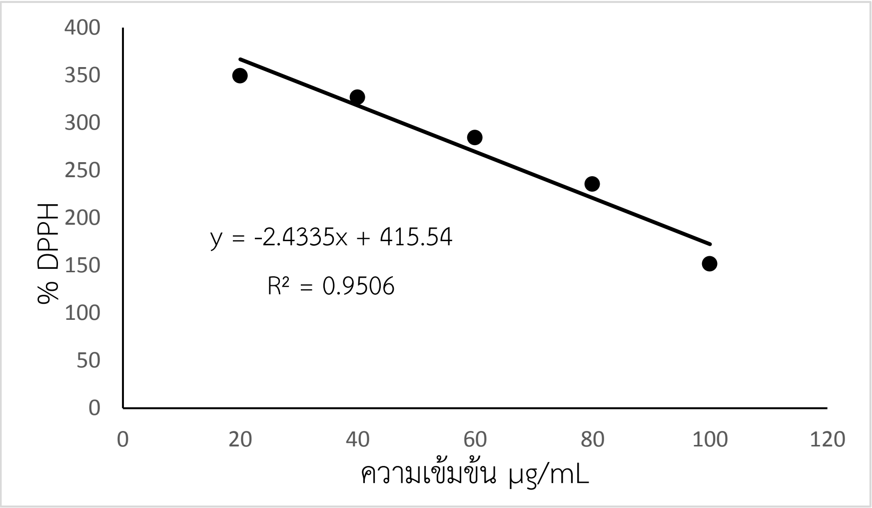
ภาคผนวก ข

กราฟสารละลายมาตรฐาน

1. กราฟสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน



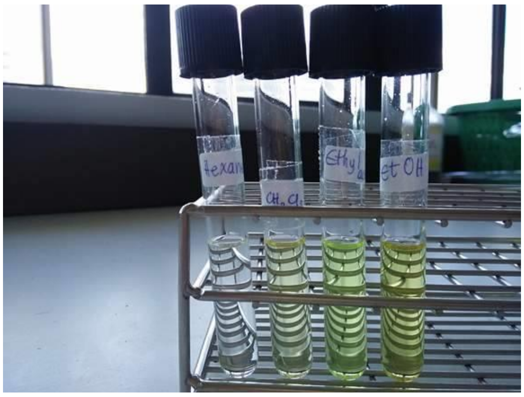
2. กราฟสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid



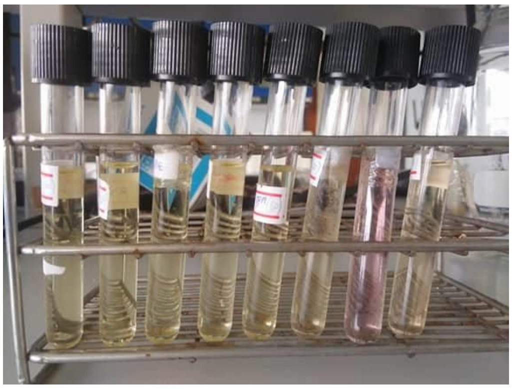
ภาคผนวก ค

สารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง

ภาพที่ 1 แสดงสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน



ภาพที่ 2 แสดงสารตัวอย่างที่ทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์



ภาพที่ 6 แสดงสารตัวอย่างที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ภาคผนวก ง หลักฐานการเผยแพร่ในรูปแบบ proceeding ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2560 ณ มหาวิทยาลัยฟาฏอนี

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นายฮาซัน ดอปอ
ตำแหน่ง	อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
หน่วยงานที่สังกัด	สาขาวิชาเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
ที่อยู่	มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000
โทรศัพท์	089-9776494
อีเมล	E-mail: hasan.d@yru.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
ปริญญาเอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต หลักสูตรโทควบเอก เคมี (เคมีอนินทรีย์) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ความเชี่ยวชาญ

การสังเคราะห์วัสดุอนินทรีย์

ผลงานวิจัย/ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1) ตีพิมพ์ผลงานวิจัย เรื่อง Flower-like Ag/AgCl microcrystal: Synthesis and activity ในวารสาร Materials Chemistry and Physics ปี 2015

2) ตีพิมพ์ผลงานวิจัย เรื่อง Urchinlike Ag/AgCl photocatalyst: Synthesis and photocatalysts ในวารสาร Applied Catalysis A: General ปี 2014

ชื่อ-นามสกุล นายอิสมะแอ เจ๊ะหลง
ตำแหน่ง อาจารย์ (ชีววิทยา)
สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา จังหวัดยะลา
หน่วยงานที่สังกัด สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
ที่อยู่ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000
โทรศัพท์ 084-2663200
อีเมล ismaair.j@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาชีววิทยา)

ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาพืชศาสตร์)
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปริญญาเอก ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (สาขาวิชาพืชศาสตร์) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ความเชี่ยวชาญ

การศึกษาด้านเรณูวิทยา (Palynology) การศึกษาสรีรวิทยาของพืช (Plant Physiology) การศึกษาน้ำผึ้ง (Honey study) และการผลิตไม้ผลเมืองร้อน (Tropical fruit production) ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product)

ผลงานวิจัย/ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1) ผลของน้ำส้มควันไม้ที่มีต่อจำนวนปากใบ ลักษณะใบ พื้นที่ใบ ขนาดท่อไซเล็มและการคายน้ำของผักบุ้งจีน

2) ผลของความเข้มข้นน้ำส้มควันไม้ต่อการเจริญเติบโตและมวลชีวภาพของกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)

ชื่อ-นามสกุล	นาย อัชมาน อาแด
ตำแหน่ง	อาจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา จังหวัดยะลา
หน่วยงานที่สังกัด	สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
ที่อยู่	มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000
โทรศัพท์	0818984695
อีเมล	nadair@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	การศึกษาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาเคมี)
ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ความเชี่ยวชาญ

เคมีพอลิเมอร์ของยางธรรมชาติ เคมีผลิภัณฑ์ธรรมชาติ การแยกสารเคมี การศึกษาปริมาณคาร์บอนองค์ประกอบในสารเคมี การทำปฏิกิริยาทางเคมี

ผลงานวิจัย/ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

1) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำส้มควันไม้จากไม้มะยม

2) องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันดินส่วนละลายเมทิลีนคลอไรด์ในน้ำส้มควันไม้จากไม้ยางพารา