



การศึกษาผลของการสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ-เอทานอล ต่อปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูล
อิสระของเถาว์ลยเป็รียง

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF WATER-ETHANOL SOLVENT EXTRACTION ON
PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *DERRIS SCANDENS*
(ROXB.) BENTH.

ฐิติพร ตันตินิกพงษ์

การศึกษามวลของการสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ-เอทานอล ต่อปริมาณพฤษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูล
อิสระของเถาวัลย์เปรียง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2567
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF WATER-ETHANOL SOLVENT EXTRACTION ON
PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *DERRIS SCANDENS*
(ROXB.) BENTH.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University
2024
Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การศึกษาผลของการสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ-เอทานอล ต่อปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระของเถาวัลย์เปรียง
ของ
จิตติพร ตันตินิพิพงษ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์จิตร์ชัย เอกปัญญากุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษา	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามิ)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตตา จิตตสุโก)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญตา จัตรีวีระสกุล)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาผลของการสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ-เอทานอล ต่อปริมาณพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเถาวัลย์เปรียง
ผู้วิจัย	จิตติพร ตันตินิพงษ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2567
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามิ
ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง

การศึกษานี้มุ่งเน้นการสกัดสาร genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside (GTG) จากเถาวัลย์เปรียง โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล-น้ำ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของปริมาณสารสกัดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameters: HSP) ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งพบว่า การใช้เอทานอล 50% ให้ผลการสกัด GTG สูงสุด อยู่ที่ 6.83 ± 0.06 mg/g dried weight และสอดคล้องกับค่าที่ทำนายจากพารามิเตอร์ดังกล่าว การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีค่าคงที่ได้อิเล็กทริกระหว่าง 50 ถึง 60 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ GTG ที่แยกได้ ทำการทดสอบด้วยเทคนิค DPPH assay ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 87.86 ± 1.85 ไมโครโมลาร์ และทดสอบด้วยวิธี FRAP assay มีค่า FRAP value เท่ากับ 34.23 ± 2.75 mg FeSO₄ equivalents การวิเคราะห์ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล (molecular orbital analysis) แสดงให้เห็นว่า ค่าพลังงานต่างระหว่าง HOMO และ LUMO (ΔE) อยู่ที่ 10.6715 eV ซึ่งใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน เช่น Gallic acid, Ascorbic acid, Trolox และ Quercetin ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพในการสกัด GTG ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ GTG มาจากความสามารถในการให้อิเล็กตรอนและการทำให้อนุมูลอิสระมีเสถียรภาพผ่านการกระจายประจุในโครงสร้างอะไคโคนอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถยืนยันถึงศักยภาพของสารสกัด GTG เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

คำสำคัญ: การเลือกตัวทำละลาย; ฟลาโวนอยด์; โพลีฟีนอล; โครมาโทกราฟี

Title	INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF WATER-ETHANOL SOLVENT EXTRACTION ON PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF <i>DERRIS SCANDENS</i> (ROXB.) BENTH.
Author	THITIPORN TANTINITHIPHONG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2024
Advisor	Associate Professor Weerasak Samee, Ph.D.
Co-Advisor	Associate Professor Sarin Tadtong, Ph.D.

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

This research investigated the extraction of genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside (GTG) from *Derris scandens* using a water-alcohol solvent system, with the goal of maximizing yield and antioxidant properties. Hansen solubility parameters (HSP) were used to identify the ideal solvent mixture, resulting in the highest GTG yield (6.83 ± 0.06 mg/g dried sample) at 50% ethanol, which aligned well with HSP predictions. Ultrasonic extraction was most efficient with solvents having dielectric constants between 50 and 60. The antioxidant activity of the extracted GTG was assessed via DPPH (IC_{50} of 87.86 ± 1.85 μ M) and FRAP (34.23 ± 2.75 mg FeSO₄ equivalents) assays. Molecular orbital analysis showed HOMO-LUMO energy gaps (~ 10.67 eV) similar to those of established antioxidants such as gallic acid, ascorbic acid, Trolox and quercetin. These results confirm that HSP is a useful tool for selecting solvents in ultrasound-assisted GTG extraction. The antioxidant activity of GTG is linked to its ability to donate electrons and stabilize radicals through extensive charge delocalization within its structure, underscoring its promise as a natural antioxidant.

Keywords: solvent selection; flavonoid; polyphenol; chromatography

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์เล่มนี้ ประสบความสำเร็จได้จากความช่วยเหลือของ
รองศาสตราจารย์ ดร.วิระศักดิ์ สามิ อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในงานชิ้นนี้ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำแนะนำในการเขียนปริญญานิพนธ์
รวมถึงการศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องในการทำ
ปริญญานิพนธ์ จนทำให้การจัดทำปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้มีความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่านในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์
ที่คอยให้คำแนะนำเพิ่มเติมและคำปรึกษาจนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ขึ้น

ฐิติพร ตันตินิกพงษ์



สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง (ถ้ามี)	ญ
สารบัญรูปภาพ (ถ้ามี)	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
สมมติฐานในการวิจัย	4
ตัวแปรที่ศึกษา	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
นิยามศัพท์เฉพาะ	5
กรอบแนวคิดการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	6
เถววัลย์เปรียง	6
สารสำคัญ	7
พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน	7
ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล	8
วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	9
ชนิดของ HPLC	9
องค์ประกอบของเครื่อง HPLC	9
หลักการทำงานของ HPLC	9
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	10
เกณฑ์การยอมรับพารามิเตอร์	12
การวิเคราะห์	13

ปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	14
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	14
ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	15
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	15
อนุมูลอิสระ (free radical).....	15
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay	16
Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	18
การเตรียมสารละลายตัวอย่าง	19
การเตรียมสาร GTG ภายในห้องปฏิบัติการ (In-house GTG)	19
การวิเคราะห์ GTG ในเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค HPLC.....	19
การคำนวณพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน.....	20
การวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	21
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	22
ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง.....	23
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเถาวัลย์เปรียง	24
การคำนวณด้วยทฤษฎีฟังก์ชันความหนาแน่น (DFT).....	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง	26
การเตรียม GTG ของเถาวัลย์เปรียงในห้องปฏิบัติการ.....	26
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ GTG ในเถาวัลย์เปรียง	26
การเลือกตัวทำละลายสำหรับการสกัด GTG ในเถาวัลย์เปรียง	28
การวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สำหรับการหาปริมาณ GTG ในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง.....	31
ตรวจความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ GTG ที่สกัดได้กับพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameters) และค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric Constants)	34

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง	36
ความสัมพันธ์ระหว่างออร์บิทัลของโมเลกุลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ GTG และสารมาตรฐาน ได้แก่ Gallic acid, Genistein, Quercetin และ Trolox	39
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	42
สรุปผลการทดลอง	42
อภิปรายผลการทดลอง	42
บรรณานุกรม	46
ภาคผนวก	54
ประวัติผู้เขียน	57
Application of Hansen Solubility Parameters in the Aqueous-Ethanol Extraction of Genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside from <i>Derris scandens</i> and Its Molecular Orbital Study on Antioxidant Activity	57

สารบัญตาราง (ถ้ามี)

หน้า

ตาราง 1 แสดงรายละเอียดของ Genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside (Sae-Foo, 2024).....	7
ตาราง 2 แสดงเกณฑ์การยอมรับของ System suitability ของเทคนิค HPLC	12
ตาราง 3 แสดงเกณฑ์การยอมรับของ Validation parameters ของเทคนิค HPLC	12
ตาราง 4 การทำนายค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameters) ของสาร GTG	29
ตาราง 5 ค่ารัศมี (Ra) ที่คำนวณได้จากค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (HSP) ของ GTG กับตัวทำละลายเอทานอล-น้ำ.....	30
ตาราง 6 ผลการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์	32
ตาราง 7 ผลการตรวจสอบความเที่ยงตรงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	32
ตาราง 8 รัศมีของพารามิเตอร์การละลายแฮนเซน (Ra) ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constants) และปริมาณ GTG ในตัวทำละลายต่าง ๆ (จำนวนตัวอย่าง n = 3).....	35
ตาราง 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content: TPC), ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content: TFC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (วัดโดยวิธี DPPH และ FRAP) ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง (n = 3)	37
ตาราง 10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและค่าพลังงาน HOMO และ LUMO (eV) ที่คำนวณได้จาก Gallic acid, Genistein, Quercetin และ Trolox	40

สารบัญรูปภาพ (ถ้ามี)

หน้า

ภาพประกอบ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside.....	7
ภาพประกอบ 2 system PATH variable	25
ภาพประกอบ 3 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย Semi-preparative HPLC เถาวัลย์เปรียงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร.....	26
ภาพประกอบ 4 กราฟมาตรฐานของ GTG	32
ภาพประกอบ 5 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอทานอล-น้ำ จากเถาวัลย์เปรียงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้ UV detection.....	34
ภาพประกอบ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ GTG ที่สกัดได้กับพารามิเตอร์ความละลาย Hansen และค่าคงที่ไดอิเล็กทริก.....	36
ภาพประกอบ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายต่าง ๆ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ในการทดสอบ DPPH	38
ภาพประกอบ 8 แผนภาพแสดง frontier molecular orbitals ของ gallic acid, genistein GTG, quercetin และ trolox โดยที่ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล HOMO แสดงด้วยสีม่วง/น้ำเงิน และ LUMO แสดงด้วยสีเขียวอ่อน/เขียวเข้ม.....	41
ภาพประกอบ 9 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน GTG	54
ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน in-house GTG	54
ภาพประกอบ 11 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 100%	54
ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80%	55
ภาพประกอบ 13 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 60%	55
ภาพประกอบ 14 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50%	55
ภาพประกอบ 15 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40%	56
ภาพประกอบ 16 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 20%	56
ภาพประกอบ 17 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ (เอทานอล 0%)	56

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เถาว์วัลย์เปรียง (*Derris scandens* (Roxb.) Benth.) เป็นสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์ในทาง การแพทย์แผนไทยมาอย่างยาวนาน โดยเฉพาะในด้านการบรรเทาอาการปวดข้อและกล้ามเนื้อ ในทางตำรายาแผนโบราณใช้สมุนไพรกับการต้มน้ำเดือดในการรับประทานเพื่อรักษาโรคและ แก้อาการต่าง ๆ อีกทั้ง ยังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเถาว์วัลย์เปรียง มีสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ในปริมาณสูง ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) ที่มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Ayameang et al., 2020; Hematulin et al., 2014; Hematulin et al., 2012; Laupattarakasem et al., 2004; Mukit et al., 2024; Puttarak et al., 2016; Sangkaew et al., 2024) โดยสารสำคัญที่สามารถแยกจาก เถาว์วัลย์เปรียง คือ Genistein-7-O- α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (GTG) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) ที่ผ่านกระบวนการ glycosylation โดยมี คุณสมบัติแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และ ฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Sae-Foo et al., 2022; Sae-Foo et al., 2024; Shahriar et al., 2023) อีกทั้งมีงานวิจัยแสดงให้เห็นถึงการดัดแปลงโครงสร้างของ genistein โดยเฉพาะ glycosylation ที่ตำแหน่ง 7-O ด้วยหมู่ α -rhamnopyranosyl และ β -glucopyranosyl อาจช่วย เพิ่มเสถียรภาพ ความสามารถในการละลายน้ำ และเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ (bioavailability) เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบ aglycone ของ genistein (Veitch, 2013) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สารฟีนอลิกอื่น ๆ ที่พบในเถาว์วัลย์เปรียงมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เสริมฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Rao et al., 2007) สำหรับกระบวนการสกัดสาร GTG จากเถาว์วัลย์เปรียง นิยมใช้ตัวทำละลายเอทานอลหรือเมทานอล เนื่องจากสามารถละลายสารพฤษเคมี (phytochemicals) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีงานวิจัยแสดงให้เห็นถึงวิธีการสกัด เช่น การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic-assisted extraction) หรือการสกัดด้วยไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึง GTG ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Hematulin et al., 2014; Sadhukhan et al., 2018; Xie et al., 2016)

ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) เป็นพารามิเตอร์พื้นฐานที่มีความสำคัญใน สาขาวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมไฟฟ้า ซึ่งสะท้อนถึงความสามารถของสารในการกักเก็บพลังงาน ไฟฟ้าเมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยค่าดังกล่าวแสดงถึงระดับที่สารสามารถเกิดโพลาริเซชันได้ เมื่อได้รับอิทธิพลจากสนามไฟฟ้า ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำความเข้าใจพฤติกรรมและการละลาย ของสารที่มีขั้วและไม่มีขั้วในตัวทำละลายต่าง ๆ โดยสารที่มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสูงเป็นสารที่มีขั้ว ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยสัมพันธ์ในลักษณะของแรงระหว่างขั้ว (dipole-dipole interaction) และพันธะ ไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ได้ดี ขณะที่สารที่มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกต่ำมักเป็นสารไม่มีขั้ว ซึ่งมี

แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลในระดับที่อ่อนกว่า เช่น แรงลอนดอน (London dispersion forces) (Galamba et al., 2019) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่ไดโพลิกทริก กับประสิทธิภาพในการสกัดสารพฤกษเคมีมีความสำคัญในสาขาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเภสัชพฤกษศาสตร์ โดยค่าคงที่ไดโพลิกทริกของตัวทำละลายมีผลต่อความสามารถในการละลายสารที่มีขั้วหรือไม่ขั้ว ซึ่งเป็นปัจจัยกำหนดในการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่มีค่าคงที่ไดโพลิกทริกสูงสามารถละลายสารที่มีขั้วได้ดี ส่วนตัวทำละลายที่มีค่าคงที่ไดโพลิกทริกต่ำจะละลายในสารที่ไม่มีขั้ว (Chamchomdao & Samee, 2020; Herrera-Pool et al., 2025; Marczyński et al., 2019; Radyukova et al., 2019; Sarkar et al., 2024) ดังนั้น การเลือกตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติเหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณของสารสกัดทางชีวภาพ

แนวคิดพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter: HSP) เป็นแนวทางที่ช่วยในการวิเคราะห์ระหว่างตัวทำละลายกับสารที่ต้องการสกัด โดยพิจารณาจากองค์ประกอบ 3 ประการ ได้แก่ แรงแพร่กระจาย (dispersion forces: δ_d) แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่มีขั้ว (polar forces: δ_p) และแรงยึดเหนี่ยวพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding: δ_h) ซึ่งเมื่อพิจารณารวมกันทำให้สามารถประเมินความเหมาะสมของตัวทำละลายต่อสารที่ต้องการสกัดได้ (Jeon et al., 2025; Sumontri, 2024) โดยได้นำมาใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีความหลากหลายในด้านคุณสมบัติทางเคมีและความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจน (Li et al., 2014; Novaes et al., 2023) ทั้งนี้ งานวิจัยของ Novaes และคณะ ได้นำเสนอการใช้พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนในการคัดเลือกตัวทำละลาย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด ลดการใช้ตัวทำละลายและเพิ่มปริมาณสารสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Novaes et al., 2023) และงานวิจัยของ Zhang และคณะ แสดงให้เห็นถึงพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสะท้อนถึงบทบาทของพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนในบริบทของการเป็นเคมีเชิงอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม (green chemistry) และวิธีการสกัดอย่างยั่งยืน (Zhang et al., 2019)

การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic-Assisted Extraction: UAE) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (flavonoid glycosides) จากพืชหลายชนิด โดยใช้พลังงานจากคลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อเพิ่มการแทรกซึมของตัวทำละลายเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช ส่งผลให้น้ำเซลล์พืชแตกออกและปล่อยสารออกฤทธิ์ภายในเซลล์ออกมา (Motsumi et al., 2020; Pham et al., 2020; Tobgay, 2020) คุณสมบัติค่าคงที่ไดโพลิกทริกของตัวทำละลายแปรผันโดยตรงกับประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด โดยตัวทำละลายที่มีค่าคงที่ไดโพลิกทริกสูงสามารถละลายสารที่มีขั้วได้ดีกว่า เช่น ฟลาโวนอยด์และไกลโคไซด์ (Liu et al., 2021; Md Yusof et al., 2019; Soib et al., 2020) กลไกของการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงอาศัยการเกิดฟองโพรงอากาศ (cavitation bubbles) ภายในตัวทำละลาย ซึ่งเมื่อยุบตัวจะสร้างคลื่นกระแทก (shock waves) ที่ช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวล (mass transfer) ของสารออกฤทธิ์จากเมทริกซ์ของพืชเข้าสู่ตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Mohamed et al., 2022)

ในการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด แนวคิดทางเคมีควอนตัม โดยเฉพาะทฤษฎีฟรอนเทียร์ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล (Frontier Molecular Orbital: FMO) ได้รับการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยพิจารณาจากระดับพลังงานของออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่ถูกครอบครองสูงสุด (HOMO) และออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่ว่างต่ำสุด (LUMO) ซึ่งช่องว่างพลังงานระหว่าง HOMO และ LUMO ที่น้อย แสดงถึงความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่สูงขึ้น เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (de Souza Farias et al., 2021; Ozalp et al., 2020) การศึกษาโครงสร้างฟลาโวนอยด์บางชนิด กลุ่มหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้างมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของ HOMO ได้ดีขึ้น และการกระจายตัวของอิเล็กตรอนทั่วทั้งโครงสร้างโมเลกุลยังส่งผลต่อเสถียรภาพของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Abdelmadjid et al., 2021; Liu et al., 2023; Sarkar et al., 2012; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2022) (Braga et al., 2020; Deviani et al., 2022) องค์ความรู้จากทฤษฎีดังกล่าว สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการออกแบบและพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Gökalp, 2018; Morad et al., 2023)

งานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดสาร GTG จากเถาวัลย์เปรียง โดยมุ่งเน้นการเพิ่มปริมาณสารดังกล่าวให้มีปริมาณสูงสุด โดยการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยเฉพาะตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เช่น เอทานอลและน้ำ ซึ่งมีสมบัติสอดคล้องกับค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนและค่าคงที่ไดอิเล็กทริก การวิเคราะห์เชิงปริมาณของ GTG ในสารสกัดใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ reverse phase ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร นอกจากนี้ ยังมีการประเมินปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้วิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power) อีกทั้ง คำนวณค่า HOMO และ LUMO ของสาร GTG และเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ gallic acid, genistein, Trolox และ quercetin งานวิจัยนี้ได้นำเสนออภิปรายเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก ปริมาณสารพฤษเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งให้ข้อมูลเชิงลึกที่มีประโยชน์ในการปรับปรุงกระบวนการสกัดให้มีประสิทธิภาพสูงสุด รวมถึงการทำความเข้าใจในกลไกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผ่านการวิเคราะห์ด้วยแนวคิดฟรอนเทียร์ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ GTG ในสารสกัดเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค HPLC
2. เพื่อพัฒนาการสกัดโดยการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัด GTG ในเถาวัลย์เปรียง โดยใช้พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน
3. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic content (TPC) และ Total flavonoid content (TFC) ในสารสกัดเถาวัลย์เปรียง
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค DPPH และ FRAP assay

5. เพื่ออธิบายกลไกการต้านอนุมูลอิสระของ GTG ด้วยทฤษฎี Frontier Molecular Orbital

สมมติฐานในการวิจัย

1. ตัวทำละลายที่แตกต่างกันจะทำให้สกัดปริมาณ GTG ได้แตกต่างกัน
2. ตัวทำละลายที่แตกต่างกันจะทำให้สกัดปริมาณ TPC และ TFC ที่แตกต่างกัน
3. สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน
4. สารที่มีความแตกต่างระหว่างพลังงาน HOMO-LUMO ต่างกันจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ
 - 1.1 ตัวทำละลายในการสกัด GTG ในเอทิลอะซิเตต
 - 1.2 วิธีวิเคราะห์ GTG ด้วยเทคนิค HPLC
 - 1.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณ TPC และ TFC
 - 1.4 วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
 - 1.5 HOMO และ LUMO energy
2. ตัวแปรตาม
 - 2.1 ปริมาณ GTG ที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค HPLC ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ
 - 2.2 ปริมาณ TPC และ TFC ในสารสกัด
 - 2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทิลอะซิเตตและสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ขอบเขตของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ GTG ในสารสกัดเอทิลอะซิเตตตามเกณฑ์การยอมรับของ ICH Guideline และ AOAC guideline
2. พัฒนาสารบริสุทธิ์ GTG จากสารสกัดเอทิลอะซิเตต
3. คัดเลือกตัวทำละลายในการสกัด GTG โดยใช้หลักการ Hansen Solubility Parameters
4. สกัดสารสกัดเอทิลอะซิเตตโดยใช้ Ultrasonic-assisted extraction
5. หาปริมาณ TPC โดยใช้ Folin-Ciocalteu Reagent method และหาปริมาณ TFC โดยใช้ $AlCl_3$ colorimetric method
6. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเอทิลอะซิเตตและสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค DPPH assay และ FRAP assay
7. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวทำละลายกับปริมาณ GTG, TPC และ TFC รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
8. คำนวณค่า molecular orbital energy ของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ genistein, gallic acid, Trolox, quercetin และ GTG พร้อมอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง molecular orbital กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นิยามศัพท์เฉพาะ

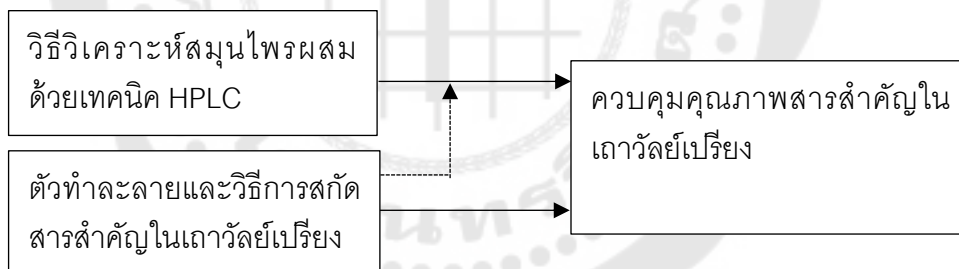
1. สารสำคัญ หมายถึง สารประกอบทางเคมีในยาที่มีผลต่อร่างกาย โดยพื้นฐานเป็นส่วนผสมที่ทำให้ยาออกฤทธิ์ (Australia Government Department of Health and Aged Care, 2023)

2. GTG หมายถึง สารสำคัญที่พบในเถาวัลย์เปรียงเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ จัดอยู่ในกลุ่ม isoflavone glycosides ประกอบด้วยแกนโครงสร้างหลัก คือ genistein ที่จับกับน้ำตาลสองชนิด คือ rhamnose และ glucose ผ่าน glycosidic bond ที่ตำแหน่ง C-7 ของ genistein โดยมีการเชื่อมต่อของน้ำตาลในลักษณะ $\alpha(1\rightarrow6)$ จัดอยู่ในกลุ่มไดไกลโคไซด์ (diglycoside) (Lin, 2007)

2. พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน หมายถึง ระบบพารามิเตอร์ที่ใช้ในการอธิบายความสามารถการละลาย โดยเฉพาะการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์หรือสารประกอบ โดยใช้หลักการ “like dissolves like” (Hansen, 2007)

3. ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล หมายถึง บริเวณโมเลกุลที่มีความน่าจะเป็นในการพบอิเล็กตรอนสูง ซึ่งเกิดจากการรวมกันของออร์บิทัลอะตอมกับอะตอมตั้งแต่สองตัวขึ้นไป โดยสามารถอธิบายความเสถียรทางเคมีและพฤติกรรมของโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาการเกิดพันธะเคมีและปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ (Atkins, 2014)

กรอบแนวคิดการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณ GTG ในเถาวัลย์เปรียงที่มีความถูกต้องและแม่นยำ
2. ได้สารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่มีปริมาณ GTG ปริมาณสูง
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพฤษเคมีและฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของเถาวัลย์เปรียง
4. สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง Frontier Molecular Orbital กับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารจากธรรมชาติ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี

1. เถาวัลย์เปรียง
2. สารสำคัญ
3. พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน
4. ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล
5. วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC
6. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
7. ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด
- 8.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เถาวัลย์เปรียง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Derris scandens* (Roxb.) Benth.

ชื่อวงศ์ FABACEAE

ชื่ออื่นๆ -

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

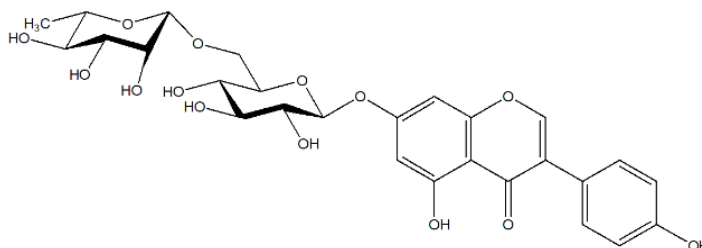
ไม้เถาเนื้อแข็ง กิ่งมีช่องอากาศ หนูปรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก ใบประกอบมีใบย่อย 9-13 ใบ ก้านใบยาว 2-5 ซม. มีหนูปย่อยขนาดเล็ก ใบรูปขอบขนานหรือแกมรูปไข่กลับ ยาว 3-8 ซม. ใบปลายมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย โคนก้านใบพอง ยาว 1.5-5 มม. ช่อดอกคล้ายช่อกระจจะออกตามซอกใบ ยาว 5-28 ซม. ก้านช่อยาว 1.5-5 ซม. ดอกออกเป็นช่อกระจสั้น ๆ โคนช่อคล้ายปุ่ม ยาว 2-6 มม. ใบประดับรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก แต่ละช่อมี 5-10 ดอก ก้านดอกยาว 6-9 มม. มีขนคล้ายไหม ใบประดับย่อยขนาดเล็ก กลีบเลี้ยงสีน้ำตาลแดงหรืออมเขียว เชื่อมติดกัน ประมาณ 2 มม. กลีบบน 2 กลีบ กลีบล่าง 3 กลีบ ดอกสีขาวอมชมพู ยาวเท่า ๆ กัน มีก้านกลีบสั้น ๆ กลีบกลางรูปไข่กลับกว้าง ยาว 5-8 ซม. ปลายเว้า กลีบปีกรูปใบหอก กลีบคู่ล่างรูปเรือ เกสรเพศผู้ 10 อัน ติด 2 กลุ่ม 9 อัน เชื่อมติดกัน ยาว 0.9-1.2 ซม. ฝักแบน รูปแถบ ยาว 4.5-9 ซม. ขอบบนเป็นปีก กว้าง 1-2 มม. เมล็ดแบน รูปรี ยาวประมาณ 7 มม. (มหาวิทยาลัยมหิดล, 2543)

สรรพคุณ

รสเผื่อนเฝื่อน ต้มรับประทานถ่ายเส้น ถ่ายกระษัย แก้เส้นเอ็นชอด ถ่ายเสมหะ ไม่ถ่ายอุจจาระ เหมาะกับการใช้ในโรคบิด ไช้หวัด ใช้ในเด็กทำให้เส้นเอ็นอ่อนลง ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะพิการ (มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ม.ป.ป.)

สารสำคัญ

GTG (ภาพประกอบ 1) พบในส่วนเถาของเถาวัลย์เปรียง (Kamonthip Jutathis, 2016)



ภาพประกอบ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside

ตาราง 1 แสดงรายละเอียดของ Genistein-7-O-[α-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-glucopyranoside (Sae-Foo, 2024)

พืชที่พบสารสำคัญ	เถาวัลย์เปรียง
สรรพคุณ	1. ด้านการอักเสบโดยการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase และ lipoxygenase 2. ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogenic activity) 3. กระตุ้นการเจริญของเซลล์ใน MCF-7 cell line
ลักษณะทางกายภาพ	ผงผลึกสีขาวถึงเหลืองอ่อน
สารประกอบ	ฟลาโวนอยด์
สูตรเคมี	$C_{27}H_{30}O_{14}$
มวลโมเลกุล	578 g/mol
การละลาย	ละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล และเอทานอล

พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน

พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter: HSP) เป็นแบบจำลองเชิงปริมาณที่ใช้ในการคาดการณ์การละลายของสาร โดยพิจารณาจากแรงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุล ได้แก่ แรงระหว่างโมเลกุลทั่วไป เช่น dispersion force, polar force และ hydrogen bonding โดยการรวมกันของทั้ง 3 แรงสะท้อนถึงพลังงานยึดเหนี่ยวภายในของสาร (cohesive energy density) ซึ่งสามารถใช้ทำนายการละลายหรือเข้ากันได้ของสารกับของเหลวหรือตัวพาอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Hansen, 2007) โดยสามารถหาความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน ได้ดังสมการ

$$\delta T = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2}$$

โดยที่ δT คือ พารามิเตอร์การละลายรวม (total solubility parameter) ซึ่งแสดงถึงตำแหน่งของสารใน Hansen space

ในทางปฏิบัติค่าที่ใช้วัดความแตกต่างระหว่างพารามิเตอร์การละลายของสารสองชนิดในระบบพิกัดสามมิติของพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน เรียกว่า Hansen distance (R_a) ซึ่งเปรียบเทียบกับรัศมีการปฏิสัมพันธ์ (interaction radius: R_0) เพื่อทำนายความสามารถในการละลาย โดยหาก $R_a \leq R_0$ แสดงถึงความเข้ากันได้หรือละลายได้ดีของสาร และ $R_a > R_0$ แสดงถึงสารมีความเข้ากันได้ต่ำ ไม่ละลายกันหรือเข้ากันไม่ได้ (Barton, 1991) โดยสามารถหารัศมีของแฮนเซนได้ดังสมการ

$$R_a^2 = 4(\delta - \delta_{D2})^2 + (\delta_{p1} - \delta_{p2})^2 + (\delta_{H1} - \delta_{H2})^2$$

โดยที่ R_a คือ รัศมีของแฮนเซน (Hansen distance)

δ_D คือ พารามิเตอร์แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (dispersion force)

δ_p คือ พารามิเตอร์โมเลกุลที่มีขั้ว (polar force)

δ_H คือ พารามิเตอร์แรงพันธะไฮโดรเจน (hydrogen force)

ดัชนี 1 และ 2 คือ สารสองชนิดที่ต้องการเปรียบเทียบ เช่น ตัวทำละลายกับ

สารตัวอย่าง

ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล

ทฤษฎีโมเลกุลออร์บิทัล (Molecular Orbital Theory) เป็นแนวคิดพื้นฐานในเคมีเชิงควอนตัมที่อธิบายพฤติกรรมของอิเล็กตรอนในระดับโมเลกุล โดยเป็นการรวมอะตอมสามารถกระจายทั่วโมเลกุลได้ โดยเกิดจากการรวมเชิงเส้นของออร์บิทัลของอะตอม (Linear Combination of Atomic Orbitals: LCAO) เพื่อสร้างออร์บิทัลเชิงโมเลกุล โดยออร์บิทัลเชิงโมเลกุลสามารถแบ่งตามหน้าที่ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ออร์บิทัลพันธะ (bonding orbital: σ, π) เพิ่มความเสถียรของโมเลกุล ออร์บิทัลต้านพันธะ (antibonding orbital: σ^*, π^*) ลดความเสถียรของโมเลกุล และออร์บิทัลไม่มีพันธะ (nonbonding orbital: n) ไม่มีผลต่อพันธะโดยตรง

ในการทำนายความไวของปฏิกิริยาเคมี โดยใช้การศึกษา Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO) ออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่มีระดับพลังงานสูงที่สุดที่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่เป็นการบ่งชี้ถึงโมเลกุลให้อิเล็กตรอนมากน้อยเพียงใด โดยหากค่า HOMO สูง มีแนวโน้มให้อิเล็กตรอนได้ดี แสดงถึงการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และ Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO) ออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่มีระดับพลังงานต่ำที่สุดที่ยังไม่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่เป็นการบ่งชี้ถึงโมเลกุลรับอิเล็กตรอนมากน้อยเพียงใด โดยหากค่า LUMO สูง มีแนวโน้มรับอิเล็กตรอนได้ง่าย และ HOMO-LUMO gap เป็นช่องว่างระหว่างพลังงาน หากช่องว่างแคบแสดงถึงโมเลกุลไวต่อปฏิกิริยาซึ่งเป็นผลดีกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Atkins, 2011)

วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

HPLC เป็นวิธีที่ใช้ประเมินทางเภสัชกรรมและทางชีวภาพทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ปรับเปลี่ยนได้ ปลอดภัย เชื่อถือได้ และรวดเร็วสุดในการวิเคราะห์คุณภาพของส่วนผสมทางยา (คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, ม.ป.ป.)

ชนิดของ HPLC

1. Normal phase chromatography การแยกขึ้นอยู่กับความมีขั้ว โดยเฟสคงที่เป็นเฟสที่มีขั้วใช้ silica ส่วนไม่มีขั้วใช้ Hexane, Chloroform และ Diethyl Ether
2. Reverse phase ตรงข้ามกับ Normal phase chromatography โดยเฟสเคลื่อนที่มีขั้ว ดังนั้น เฟสคงที่จึงไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำ
3. Size-exclusion คอลัมน์ผสมผสานกับโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ได้รับการควบคุมอย่างแม่นยำ เนื่องจากความแตกต่างในขนาดโมเลกุล ทำให้สามารถแยกองค์ประกอบได้
4. Ion-exchange เฟสคงที่มีพื้นผิวที่มีประจุตรงข้ามกับประจุตัวอย่าง เฟสเคลื่อนที่คือ binary compound buffer ซึ่งสามารถปรับระดับ pH และความแข็งแรงของไอออนได้ (Mukherjee S, 2019)

องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

1. Solvent reservoir ตัวทำละลาย หรือเฟสเคลื่อนที่ เป็นสารที่อยู่ในภาชนะแก้ว ซึ่งใน HPLC เป็นส่วนผสมของส่วนประกอบของเหลวที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยตัวทำละลายที่มีขั้วหรือไม่มีขั้วจะเปลี่ยนไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบตัวอย่าง
2. Sample injector เข็มฉีดอาจเป็นส่วนผสมเดียวหรือโครงสร้างส่วนผสมอิเล็กทรอนิกส์ สำหรับฉีดสารเข้า HPLC
3. Pump ดูดส่วนเคลื่อนที่จากตัวทำละลายผ่านคอลัมน์ไปยังเครื่องตรวจวัด (Detector) ซึ่งขึ้นอยู่กับการขนาดคอลัมน์ ขนาดอนุภาค อัตราการไหล และองค์ประกอบของส่วนเคลื่อนที่
4. Column ทำจากสแตนเลสที่สะอาด หน่วยมีพื้นที่ประมาณ 50 มิลลิเมตร และยาว 300 มิลลิเมตร ระยะห่างด้านในประมาณ 2-5 มิลลิเมตร โดยมักบรรจุส่วนคงที่ขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 3 ถึง 10 มิลลิเมตร
5. Detector ตั้งอยู่ในตำแหน่งไปทางคอลัมน์ที่เสร็จสิ้นการระบุการวิเคราะห์ขณะที่แยกออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยเครื่องตรวจจับที่ใช้บ่อย ได้แก่ UV-spectroscopy, fluorescence, mass spectrometric และตัวระบุทางเคมีไฟฟ้า (Mukherjee S, 2019)

หลักการทำงานของ HPLC

กลไกการทำงาน (สุภาณี ดวงธีรปรีชา, 2561)

HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบและวิเคราะห์สารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งมีกระบวนการแยกสารประกอบระหว่างเฟส 2 เฟส ได้แก่ เฟสคงที่ (Stationary phase) ซึ่งอยู่ในคอลัมน์ (Column) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ผสม โดยมีการทำงาน ดังนี้

1. สารเข้าคอลัมน์โดยตัวทำละลายอินทรีย์ผสมเพื่อให้เกิดการแยกสาร โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากับสารที่อยู่ภายในคอลัมน์และความสามารถในการละลายของสารผสม
2. สารผสมที่อยู่ในตัวอย่างแยกออกจากกันได้ขึ้นอยู่กับความเข้ากันของสารกับ mobile phase หรือ stationary phase โดยแต่ละสารจะมีเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (Retention time) เฉพาะตัว
3. สารที่ถูกแยกออกมาจับโดย Detector ที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดเป็นพีค (Peak) เรียกว่า Chromatogram
4. ในการวิเคราะห์จะนำพื้นที่ใต้พีคของแต่ละสารมาคำนวณผล เปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐาน (Calibration curve) ทำให้ทราบปริมาณของสารตัวอย่าง

การชะสาร

1. Isocratic elution การไหลของเฟสเคลื่อนที่มีอัตราคงที่ตลอดกระบวนการชะสาร
2. Gradient elution การไหลของเฟสเคลื่อนที่จะเปลี่ยนแปลงทีละน้อยเป็นระยะในระหว่างกระบวนการชะสาร

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

System suitability parameters

1. Specificity (ความเฉพาะเจาะจง) ความสามารถของวิธีในการจำแนกสารที่สนใจ วิเคราะห์ให้ออกจากสารอื่น ๆ รวมถึงสารปนเปื้อน สารที่เกิดจากการสลายตัวและเมทริกซ์
2. Capacity factor (k') บอกค่าความหน่วงของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราการไหล ความยาวคอลัมน์ และเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์ โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

โดย t_r คือ retention time ของพีค

t_0 คือ เวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้เคลื่อนที่ในคอลัมน์

3. Resolution (R_s) บอกค่าความสามารถในการแยกสาร พิจารณาจาก R_f จากอัตราส่วนของระยะห่างระหว่างจุดสูงสุด 2 จุด โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

โดย t คือ retention time ของสาร 2 ตัวที่แยกออกจากโครมาโทแกรม

W คือ ความกว้างของพีคที่ฐานของสาร 2 ตัว

4. Column efficiency (N) บอกประสิทธิภาพของคอลัมน์ จำนวน plate ในทางทฤษฎี บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี โดยคอลัมน์มีขนาดตั้งแต่ 5,000 – 1,000,000 plates/number โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{W_{\tan}} \right]^2$$

โดย R หรือ t คือ retention time

W คือ ความกว้างของพีคพื้นฐาน

5. Peak symmetry (Tailing factor: T) เป็นเกณฑ์ประเมินประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

โดย $W_{0.05}$ คือ ความกว้างของพีคที่ความสูงร้อยละ 5

f คือ เวลาของสารจาก peak front ถึง peak maximum

6. %RSD ของ retention time (6 ซ้ำ) บอกความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%RSD = \frac{S.D.}{\bar{X}} 100$$

โดย S.D. คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ retention time

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของ retention time

7. %RSD ของ peak area (6 ซ้ำ) บอกความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%RSD = \frac{S.D.}{\bar{X}} 100$$

โดย S.D. คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak area

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของ peak area

Validation parameters

1. Working range (ช่วงการใช้งาน) ช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวัดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วัดแล้วมีความถูกต้อง ความเที่ยงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ยอมรับได้

2. Linearity (ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง) ความสามารถของวิธีที่จะทำให้วิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงที่กำหนด

3. Accuracy (ความแม่นยำ) ความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นเปรียบเทียบกับค่าจริงหรือค่าอ้างอิงที่เป็นที่ยอมรับ

4. Precision (ความเที่ยง) ความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำ หลาย ๆ ครั้ง โดยตัวอย่างต้องเป็นเนื้อเดียวกัน ความเที่ยงแบ่งได้ 3 ระดับ ได้แก่

4.1 Repeatability คือ การแสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ชุดการวิเคราะห์ซ้ำที่ทำในสภาวะเดียวกัน ในระยะเวลาที่ห่างกันไม่นาน

4.2 Intermediate precision คือ การแสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ชุดการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำ โดยมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เช่น เปลี่ยนเครื่องมือ เปลี่ยนผู้วิเคราะห์ เปลี่ยนวัน

4.3 Reproducibility คือ การแสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ ที่ทำโดยห้องปฏิบัติการหลายห้อง โดยทั่วไปใช้ในการนำเสนอวิธีใหม่ที่จะใช้เป็นวิธีมาตรฐาน

5. Limit of Detection (ค่าที่ต่ำที่สุดที่ตรวจวัดได้) ปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างใด ๆ ที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่จำเป็นต้องทราบว่ามีปริมาณที่แน่นอนเท่าใด

6. Limit of Quantitation (ค่าที่ต่ำที่สุดที่วัดปริมาณได้) ปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถตรวจหาเชิงปริมาณโดยมีความถูกต้องและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม

7. Robustness (ความคงทน) แสดงถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ว่ายังคงน่าเชื่อถือถึงจะมีการเปลี่ยนแปลงบางตัวแปร

เกณฑ์การยอมรับพารามิเตอร์

System suitability

ตาราง 2 แสดงเกณฑ์การยอมรับของ System suitability ของเทคนิค HPLC

Parameter	Acceptance criteria
Resolution (Rs)	>2
Column efficiency (N)	>2500
Tailing factor (T)	± 1.2
%RSD ของ retention time (6 ซ้ำ)	<2%
%RSD ของ peak area (6 ซ้ำ)	<2%

Validation parameters

ตาราง 3 แสดงเกณฑ์การยอมรับของ Validation parameters ของเทคนิค HPLC

Parameter	Acceptance criteria
Accuracy	%Recovery 95-105%
Precision	RSD<2%
Linearity	Correlation coefficient NLT 0.995
Detection Limit	(3xSD of intercept)/mean slope
Qualitative Limit	(10xSD of intercept)/mean slope
Robustness	RSD <2% (varies % of mobile phase, Temp±1 °C)

การวิเคราะห์

1. เชงคุณภาพ

1.1 การเปรียบเทียบค่า retention time คือ เวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ได้เท่ากับ 1 คอลัมน์ ซึ่งมีค่าเท่ากับความยาวของคอลัมน์ หากด้วยอัตราความเร็วของการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในโครมาโทแกรม โดยเริ่มจากการวิเคราะห์สารตัวอย่างก่อน แล้ววิเคราะห์สารมาตรฐานที่ภาวะเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบ

1.2 การ spiking เป็นวิธีที่เหมาะสมในการระบุพิกแต่ละพิกว่าเป็นสารใด สำหรับสารที่ทราบชนิดและต้องการหาตำแหน่งของพิกแต่ละพิก ซึ่งทำได้โดยเติมสารมาตรฐานที่เป็นชนิดเดียวกับสารตัวอย่าง ลงในสารตัวอย่าง ซึ่งจะพบพิกของสารตัวอย่างที่เติมลงไป มีความสูงของพิกหรือพื้นที่ของพิกมากขึ้น

2. เชงปริมาณ

2.1 ความสูงของพิก (peak height) ซึ่งได้จากสัญญาณไฟฟ้าของเครื่องตรวจวัดสัญญาณ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไป เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก แต่ความสูงของพิกจะแปรเปลี่ยนได้ค่อนข้างมาก

2.2 การวัดพื้นที่ของพิก (peak area measurement) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารหรือความเข้มข้นสาร

2.2.1 วิธีวัดด้วยหลายวิธี ได้แก่

2.2.1.1 Triangular โดยแบ่งเป็นการวัดแบบความกว้างของพิกที่มีความสูงครึ่งหนึ่ง และวัดความกว้างของฐานพิก

2.2.1.2 Planimetry ใช้ planimeter ในการวัดขนาดพื้นที่ของพิก

2.2.1.3 Cut and weight เป็นวิธีการตัดพิก แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

2.2.1.4 Disc integrator เป็นเครื่องมือนับกระดาษพื้นที่โดยรวม

2.2.1.5 Electronic digital integrator ใช้เครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์ในการนับพื้นที่

2.2.1.6 Computer

2.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณ ได้ดังวิธีต่อไปนี้

2.2.2.1 External standard เป็นวิธีการทำ standard curve จากสารมาตรฐาน โดยขนาดพื้นที่พิกของตัวอย่างต้องอยู่ระหว่างพื้นที่พิกที่น้อยที่สุดของสารมาตรฐาน

2.2.2.2 Internal standard ต้องมีการพิจารณาคุณสมบัติของสาร ต้องไม่เป็นองค์ประกอบสารตัวอย่าง ต้องแยกออกจากตัวอย่างได้ โดยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสาร ในตัวอย่างมีความบริสุทธิ์มาก ต้องมีปริมาณใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง และสารนั้นจะต้องมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถทำได้โดย

2.2.2.2.1 วิธี classical โดยการเติมสาร Internal standard ลงในสารมาตรฐาน ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น พื้นที่พิกและ respond factor

2.2.2.2.2 วิธี stock solution ประกอบด้วยสารละลายมาตรฐานที่เติม Internal standard และสารละลายตัวอย่างที่เติม Internal standard ในปริมาณที่เท่ากัน

2.2.2.2.3 วิธี Internal standard plot โดยการเตรียม

2.2.2.2.3.1 สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และเติม Internal standard ในปริมาณที่เท่ากัน

2.2.2.2.3.2 สารละลายมาตรฐานผสม (Internal standard และสารละลายตัวอย่าง) และเติมสารละลายตัวอย่างที่ทราบปริมาณในสารละลายมาตรฐานผสม

2.2.2.2.3.3 สารละลายตัวอย่าง (สารละลายตัวอย่างและ Internal standard)

2.2.2.3 Standard addition เป็นการเติมสารมาตรฐานไปในสารตัวอย่าง

2.2.2.3.1 External standard และ Internal standard ใช้วิเคราะห์เมื่อสารตัวอย่างมี 2-3 ตัว โดยนำสารตัวอย่างไป spiking ด้วยสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

2.2.2.3.2 Standard addition calibration curve โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วเติมสารตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากัน โดยสามารถหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้จากการลากเส้นประต่อจากเส้นกราฟตัดแกน x จะได้ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, ม.ป.ป.)

ปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มของเมแทบอลิต์ทุติยภูมิจากพืชที่มีความหลากหลายทางโครงสร้าง ซึ่งมีลักษณะเด่นคือการมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ติดอยู่กับวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) สารกลุ่มนี้พบได้อย่างแพร่หลายในอาหารจากพืช เช่น ผลไม้ ผัก ชา กาแฟ และไวน์แดง และเป็นที่ยอมรับในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ (Barbosa-Pereira, 2014; Pourreza, 2013)

กลไกการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกสามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกต่าง ๆ ได้แก่

1. Hydrogen Atom Transfer (HAT) การให้อะตอมไฮโดรเจนเพื่อทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียร

2. Single Electron Transfer (SET) การถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหนึ่งไปยังอีกโมเลกุลหนึ่ง พบได้บ่อยในกระบวนการออกซิเดชัน-รีดักชัน (redox reactions)

3. Sequential Proton Loss Electron Transfer (SPLET) กลไกแบบผสมระหว่างการถ่ายโอนโปรตอนและอิเล็กตรอน

4. Metal Chelation การจับกับไอออนของโลหะ เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เร่งโดยโลหะ (metal-catalyzed oxidation) (Thaipong et al., 2006)

กลไกเหล่านี้มีบทบาทร่วมกันในการปกป้องเซลล์และเนื้อเยื่อจากความเสียหายที่เกิดจากออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสาเหตุร่วมในพยาธิสภาพของโรคเรื้อรังหลายชนิด (Singleton, 1999)

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกกับศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิกสามารถให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนเพื่อลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลอิสระได้โดยตรง โดยทั่วไปตัวอย่างที่มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงแสดงถึงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น (Barbosa-Pereira, 2014) ดังนั้น การวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด จึงเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยเพื่อประเมินการต้านอนุมูลอิสระ

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) ที่มีความหลากหลายทางโครงสร้าง และพบได้อย่างแพร่หลาย เช่น ผลไม้ ผัก ชา ไวน์ และโกโก้ สารกลุ่มนี้เป็นที่รู้จักกันดีในด้านคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant properties) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการส่งเสริมสุขภาพและการป้องกันโรค (Pietta, 2000)

กลไกการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์

1. การจับอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging) ฟลาโวนอยด์สามารถให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนเพื่อทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียร ส่งผลให้ลดออกซิเดชันในระดับเซลล์

2. การจับโลหะ (Metal Chelation) ฟลาโวนอยด์สามารถจับกับไอออนของโลหะหนัก เช่น เหล็กหรือทองแดง ช่วยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เร่งโดยโลหะ

3. การยับยั้งเอนไซม์ (Inhibition of Enzymes) ฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างอนุมูลของออกซิเจน ช่วยลดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มเติม

กลไกดังกล่าวข้างต้น ส่งผลให้ฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับการออกซิเดชัน เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง และโรคเกี่ยวกับความเสื่อมเร็ว

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ เป็นโมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน โดยปกติร่างกายมีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่ร่างกายมีการเสียอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระจะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดสมดุล ส่งผลให้เซลล์ในร่างกายเสียหาย โดยอนุมูลอิสระ เช่น O_2^- Superoxide anion, $OH\cdot$ Hydroxyl radicle, Hydrogen Peroxide และ Lipid Peroxyl

โดยการเกิดอนุมูลอิสระมีด้วยกันหลายสาเหตุด้วยกัน ตัวอย่างเช่น ร่างกายขาดวิตามินและเกลือแร่บางชนิด รังสียูวี มลพิษ สารเคมีปนเปื้อน ยาฆ่าแมลง การรับประทานอาหารที่ผ่านการทอดด้วยอุณหภูมิสูง และสารปรุงแต่งอาหาร หรือแม้กระทั่งความเครียดและพักผ่อนไม่เพียงพอ (Wichaya Pongklam, 2563) ปัจจุบันดังกล่าวข้างต้นข้างต้น ทำให้เกิด

Oxidative stress ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายขาดความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบและเสียหาย เมื่อเซลล์อักเสบและเสียหายติดต่อกันก็อาจเพิ่มความเสี่ยงของโรคบางอย่างได้ (Pobpad, ม.ป.ป)

การป้องกันการเกิด Oxidative stress เริ่มจากการปรับสมดุลของอนุมูลอิสระให้เหมาะสม ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พบได้เฉพาะในสารต้านอนุมูลอิสระ (Pobpad, ม.ป.ป) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งช่วยต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นไม่ให้อนุมูลอิสระสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ หรือทำลายระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยปกติร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้เอง และสร้างน้อยลงเมื่ออายุมากขึ้น แต่เมื่อเทียบกับแล้วอนุมูลอิสระนั้นเกิดขึ้นในร่างกายได้เร็วกว่ามาก แต่สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายผลิตขึ้นเองอย่างเดียวย่อมไม่เพียงพอที่จะยับยั้งของเสียเหล่านี้ จึงมีแหล่งจากภายนอกช่วยด้วย ซึ่งพบได้มากในกลุ่มวิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี แอสตาแซนธิน กรดแอลฟาไลโปอิก เบตาแคโรทีน ลูทีน ไลโคปีน ซีลีเนียม และโอเมก้า-3 (Wichaya Pongklam, 2563) จากคุณสมบัติข้างต้นของสารต้านอนุมูลอิสระนั้น ถือเป็นคุณสมบัติที่ดีและมีประโยชน์ โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ดังนี้

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

DPPH เป็นอนุมูลที่มีความเสถียรมาก เนื่องจากการแยกออกจากอนุมูลในวงแหวนอะโรมาติก การทดสอบ DPPH ที่ทำให้เป็นกลาง ขึ้นอยู่กับการให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอนุมูล DPPH ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ให้สีม่วงเข้ม แต่เมื่ออิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวได้รับอิเล็กตรอนสีจะเริ่มเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อน (Bibi Sadeer et al., 2020) สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{[(\text{Abs control} - \text{Abs sample})]}{\text{Abs control}} \times 100$$

โดยที่ A_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

A_{control} คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH (มานอก & ลิ้มเจริญ, 2558)

ข้อดี

1. เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูกและมีความรวดเร็ว เนื่องจากอนุมูลมีความเสถียรและไม่จำเป็นต้องสร้างขึ้น
2. สามารถแสดงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในระบบชีวภาพที่ซับซ้อน
3. เวลาในการกำจัดอนุมูล คือ 30 นาที ทำให้ DPPH สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถึงแม้จะเป็น weak antioxidants
4. ผลลัพธ์สามารถทำซ้ำได้และเทียบเคียงได้กับวิธีการกำจัดอนุมูลอื่น ๆ
5. มีประสิทธิภาพสำหรับสารประกอบที่ไม่เสถียรทางความร้อน เนื่องจากการกำจัดอนุมูลอิสระวัดได้ที่อุณหภูมิห้อง
6. มีความไวสูง

ข้อจำกัด

1. DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่ไม่พบในร่างกาย
2. อนุมูลอิสระ DPPH ละลายเฉพาะตัวทำละลายอินทรีย์ (lipophilic)
3. DPPH มีแนวโน้มที่จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

ที่ทดสอบ

4. DPPH มีความไวต่อ Lewis bases
5. เมื่อสัมผัสกับแสงค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH มีแนวโน้มลดลง

จึงจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ในที่มืด (Bibi Sadeer et al., 2020)

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

หลักการของสารต้านออกซิเดชันที่สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอริก $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอรัส $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ จากสารละลายสีเหลืองจะถูกเปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงินม่วง โดยปริมาณของ $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้น คือ ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (บัณฑิตวรณ ฐระพระ et al., 2559) เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือน้ำเงินม่วง

ข้อดี

1. วิธีที่ทำได้ง่ายและราคาไม่แพง
2. ทำซ้ำได้สูงและมีความไวสูง
3. สามารถตรวจตัวอย่างทางชีวภาพได้หลากหลาย และสารสกัดอินทรีย์

ของยา อาหาร และพืช

ข้อจำกัด ไม่จำเพาะเจาะจง (Bibi Sadeer et al., 2020)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

สารเคมี

1. เถาวัลย์เปรียง (ร้านโพธิ์ประดิษฐ์, กรุงเทพมหานคร)
2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
3. Acetonitrile (Chromatography-grade) (Merck, Darmstadt, Germany)
4. Ethanol (Merck, Darmstadt, Germany)
5. Ferrous sulfate (FeSO_4) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
6. Formic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)
7. Genistein-7-O- α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (GTG)
(ศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ ภูตะลุน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)
8. Methanol (Chromatography-grade) (Merck, Darmstadt, Germany)

เครื่องมือ

1. Analytical Balance 4 Digits and 5 Digits (METTLER TOLEDO, Mettler-Toledo International Inc., Switzerland)
2. HPLC (YL clarity® YL 9100, YL Instrument, Korea)
3. HPLC (Preparative) (YL9100, YL Instrument, Korea)
4. Microplate Reader (ClarioStar, BMG Labtech, Ortenberg, Germany)
5. Rotary Evaporator (BÜCHI, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland)
6. Sonicator (GT SONIC, GT SONIC Technology Co., Ltd., China)
7. Vacuum Filtration (GAST®, USA)
8. Water Purification System (aqua MAX™, YOUNGLIN Instrument, Korea)

อุปกรณ์

1. Beaker
2. Dropper
3. Erlenmeyer flask
4. Filter paper Whatman No.41 (Whatman, Cytiva, United Kingdom)
5. Mesh No.60
6. Micropipette (Rainin, Mettler-Toledo, USA)
7. Multi channel pipette (Sartorius™ Biohit™ Proline™, Sartorius, Finland)
8. Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm (CNW Technologies, ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc., China)
9. Pipette

10. Stirring rod

11. Vial

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ชั่งผงเถาวัลย์เปรียง 10 กรัม ผสมกับตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 (w/v) โดยเตรียมแยกตามชนิดของตัวทำละลาย
2. นำไปผ่านกระบวนการ Sonication โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic waves) เป็นเวลา 30 นาที
3. กรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filtration)
4. นำมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ตัวทำละลายใหม่ทุกครั้ง
5. รวมสารสกัดทั้งหมด และนำไประเหยแห้ง (Rotary evaporator)
6. ชั่งน้ำหนักสารสกัดแห้ง
7. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

การเตรียมสาร GTG ภายในห้องปฏิบัติการ (In-house GTG)

สารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเถาวัลย์เปรียง ปริมาณ 1 กรัม ละลายซ้ำในน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงทำการแยกชั้นด้วยเอทิลอะซีเตตปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อแยกสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (non-polar compounds) ออกจากสารสกัดที่อยู่ในน้ำ สารสกัดที่ได้จากกระบวนการแยกชั้น นำไปฉีดเข้าสู่ระบบ semi-preparative HPLC เพื่อทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์

ระบบ semi-preparative HPLC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ YL9100 series (YL Instrument Co., Yongin City, South Korea) โดยใช้คอลัมน์ Thermo Scientific™ Hypersil™ PREP C8 HPLC (ขนาด 250×20 มม., อนุภาค 10 ไมครอน; Waltham, MA, USA) เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยน้ำและเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 (50%) flow rate 5 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และเวลา 40 นาที สารสกัดเตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ injection volume 2 มิลลิลิตร ส่วนของสารที่ได้ประกอบด้วย GTG ถูกทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้น ทำการตรวจสอบยืนยันสารดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบ retention time และมวลโมเลกุล (mass spectra) กับสารมาตรฐาน GTG โดยใช้เทคนิค LC-MS

การวิเคราะห์ GTG ในเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค HPLC

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ GTG ด้วยเทคนิค HPLC-MS

การแยกสารใช้คอลัมน์ Agilent Eclipse Plus C18 RRHD (ขนาด 2.1×100 มม. ขนาดอนุภาค 1.8 ไมครอน; Böblingen, Germany) อุณหภูมิคอลัมน์ 25°C และอุณหภูมิของตัวอย่างใน autosampler 10°C flow rate 0.5 มิลลิลิตร/นาที โดยมีองค์ประกอบของเฟส A คือ กรดฟอสฟอริก 0.1% ในน้ำบริสุทธิ์ และเฟส B คือ กรดฟอสฟอริก 0.1% ในอะซิโตน ไตรเอิล วิเคราะห์ภายใต้ gradient elution โดยเริ่มต้นด้วยเฟส B ที่ความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น

40% ภายในเวลา 5 นาที และเพิ่มเป็น 70% ภายในเวลาอีก 5 นาที จากนั้นคงที่ที่ 70% เป็นเวลา 5 นาที ก่อนลดกลับเป็น 5% ภายในเวลา 10 นาที และคงไว้ที่ 5% อีก 10 นาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 °C และ injection volume 5 ไมโครลิตร ระบบ LC ถูกเชื่อมต่อกับเครื่อง Mass spectrometer แบบ single quadrupole รุ่น Agilent 6130 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) ซึ่งใช้อินเตอร์เฟซแบบ electrospray ionization (ESI) การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลดำเนินการผ่านซอฟต์แวร์ OpenLab (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) การตรวจวัดด้วย LC-MS แบบ single quadrupole (SQ-MS) ดำเนินการอยู่ในโหมด selected ion monitoring (SIM) พารามิเตอร์ที่ใช้ในระบบ Mass spectrometer ประกอบด้วย Capillary voltage +3,000 โวลต์ Drying gas flow 3.0 ลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 300 °C และ Nebulizer pressure 20 psi โดยใช้ไนโตรเจน ทั้งในโหมดการไอออนไนซ์แบบประจุบวก (ESI+) และแบบประจุลบ (ESI-)

2. การหาปริมาณสาร GTG ในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง ด้วยเทคนิค HPLC-PDA

ระบบที่ใช้ คือ Agilent 1260 Infinity II series (Santa Clara, CA, USA) ระบบนี้ประกอบด้วย quaternary pump, autosampler, multi-column thermostat และ photodiode array detector (PDA) ใช้คอลัมน์ ACE 5 C18-AR (ขนาด 4.6 × 250 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน) จาก Aberdeen, Scotland ร่วมกับคอลัมน์การ์ดชนิด C18 ของบริษัท Phenomenex (ขนาด 4 × 3 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน) จาก Torrance, CA, USA เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย เฟส A คือ กรดฟอสฟอริก 0.1% ในน้ำบริสุทธิ์ และเฟส B คือ กรดฟอสฟอริก 0.1% ในอะซีโตไนไตรล์ ตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมล่วงหน้าจะถูกวิเคราะห์ภายใต้ gradient elution เริ่มต้นที่เฟส B ความเข้มข้น 15% และเพิ่มขึ้นเป็น 25% ภายในเวลา 20 นาที จากนั้นเพิ่มเฟส B ต่อเนื่องจนถึง 90% ภายใน 5 นาที คงระดับ 90% นี้ไว้อีก 5 นาที ลดระดับกลับไป 15% ภายใน 3 นาที และคงไว้ที่ระดับนี้อีก 7 นาที โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 25 °C และ injection volume 10 ไมโครลิตร วิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นได้รับการทดสอบความเหมาะสมของระบบและการตรวจสอบความถูกต้องเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดโดย International Council for Harmonisation (ICH) (Guideline, 2022) เช่นเดียวกับ AOAC Guideline 2016 (Paez et al., 2016)

การคำนวณพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน

ค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameters: HSPs) สำหรับสาร GTG ถูกคำนวณโดยใช้วิธีการหาค่าจากกลุ่มโครงสร้าง (group contribution method) ตามที่ Stefanis และคณะ ได้อธิบายไว้ โดยอิงจากโครงสร้างโมเลกุลของสาร GTG โดยค่าพารามิเตอร์ประกอบด้วย dispersion force (δ_d), dipolar intermolecular force (δ_p) และ hydrogen bonding energy (δ_h) ซึ่งคำนวณโดยใช้สมการ (1), (2) และ (3) ตามลำดับ

$$\delta_d = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 17.3231 \right) \text{MPa}^{1/2} \quad (1)$$

$$\delta_p = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7.3548 \right) \text{MPa}^{1/2} \quad (2)$$

$$\delta_{hb} = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7.9793 \right) \text{MPa}^{1/2} \quad (3)$$

โดยที่ (C_i) หมายถึง ค่าการมีส่วนร่วมของกลุ่มโครงสร้างลำดับที่หนึ่ง (first-order group) ประเภทที่ i ซึ่งปรากฏอยู่ในโครงสร้างเป้าหมายจำนวน (N_i) ครั้ง

(D_j) หมายถึง ค่าการมีส่วนร่วมของกลุ่มโครงสร้างลำดับที่สอง (second-order group) ประเภทที่ j ซึ่งปรากฏอยู่จำนวน (M_j) ครั้ง

ค่าคงที่ (W) กำหนดให้ เท่ากับ 0 สำหรับสารประกอบที่ไม่มีโครงสร้างลำดับที่สอง และเท่ากับ 1 หากมีโครงสร้างลำดับที่สองปรากฏอยู่

ตัวทำละลายที่มีค่า HSP ใกล้เคียงกับของสาร GTG จะได้รับการเลือกให้เป็น ตัวทำละลายสำหรับการสกัด ความเข้ากันได้ระหว่างตัวทำละลายกับสารที่ต้องการสกัด พิจารณา จากค่ารัศมี (R_a) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ (4)

$$Ra^2 = 4 \left(\delta_{di} - \delta_{dj} \right)^2 + \left(\delta_{pi} - \delta_{pj} \right)^2 + \left(\delta_{hi} - \delta_{hj} \right)^2 \quad (4)$$

โดยที่ i หมายถึง ค่าพารามิเตอร์การละลายของเส้นเซนของสารละลาย (solute)

j หมายถึง ค่าพารามิเตอร์การละลายของเส้นเซนของตัวทำละลาย (solvent)

การวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์สาร GTG ใช้ระบบโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) ภายใต้เงื่อนไขดังนี้:

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารด้วยเทคนิค HPLC

1. เครื่อง Agilent 1260 Infinity II series (Santa Clara, CA, USA) ประกอบด้วย

- 1.1 Quaternary pump
- 1.2 Autosampler
- 1.3 Multi-column thermostat
- 1.4 Photodiode array detector

2. ศึกษาคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร

2.1 Column: ACE 5 C18-AR (ขนาด 4.6 × 250 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน) จาก Aberdeen, Scotland

2.2 Guard column: Phenomenex C18 (ขนาด 4 มม. × 3 มม. × 5 ไมครอน) จาก Torrance, CA, USA

3. ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

3.1 เฟส A: 0.1% Formic acid ใน Deionized water

3.2 เฟส B: 0.1% Formic acid ผสมกับ Acetonitrile

4. ศึกษาการชะสารแบบ Gradient

เริ่มต้นเฟส A 85% เฟส B 15% จากนั้นเฟส A ความเข้มข้น 85% ปรับเป็น 75% ภายในเวลา 20 นาที จากนั้นลดเฟส A กลับเป็น 10% ภายใน 5 นาที และคงที่ไว้อีก 5 นาที และเพิ่มขึ้นเป็น 85% ภายใน 3 นาที และคงระดับนี้อีก 7 นาที

5. ศึกษาสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

5.1 Flow rate 1 มิลลิลิตร/นาที

5.2 Wavelength 260 นาโนเมตร

5.3 Temperature 25 องศาเซลเซียส

5.4 Injection volume 10 ไมโครลิตร

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

วิธีการ HPLC ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องตามแนวทางของ AOAC โดยประเมินพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ความเป็นเชิงเส้น (linearity), ค่าที่ต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) ค่าที่ต่ำสุดในการหาปริมาณ (LOQ) ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยงตรง (precision)

ความจำเพาะ (Specificity)

ความจำเพาะของการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้รับการประเมินโดยการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน GTG กับสารละลายตัวอย่าง โดยวัดค่าที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าสัญญาณของพีคมาตรฐานสามารถแยกออกจากพีคอื่น ๆ ในโครมาโทแกรมของตัวอย่างได้อย่างชัดเจน โดยพิจารณาจาก retention time ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ ความจำเพาะยังได้รับการยืนยันเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งในส่วนของสารมาตรฐานและตัวอย่าง

ความเป็นเชิงเส้น (Linearity)

calibration curve แบบ 6 จุด สร้างขึ้นจากความเข้มข้นที่ของ GTG ในช่วง 25 - 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) โดยแสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (correlation coefficient) มากกว่า 0.995 ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของ AOAC การวัดทั้งหมดดำเนินการทำซ้ำ 3 ครั้ง

ค่าที่ต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) และค่าที่ต่ำสุดในการหาปริมาณ (LOQ)

จากสมการเชิงเส้นที่ได้ ค่าที่ต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) และค่าที่ต่ำสุดในการหาปริมาณ (LOQ) โดยคำนวณได้ดังนี้

$$\text{LOD} = 3.3 \times (\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน Y}) / (\text{ค่าเฉลี่ยของความชันของกราฟ})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times (\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน Y}) / (\text{ค่าเฉลี่ยของความชันของกราฟ})$$

โดยที่ค่าของ LOD และ LOQ ได้จากการคูณ 3.3 และ 10 ตามลำดับ กับอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกราฟต่อความชันเฉลี่ย

ความแม่นยำ (Accuracy)

การประเมินประสิทธิภาพ %recovery ของวิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้น ดำเนินการโดยการเติมสารมาตรฐาน GTG ลงในตัวอย่าง (spiked sample) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 40, 80 และ 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) จากนั้นคำนวณโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้กับค่าที่ทราบแน่นอนของตัวอย่างที่เติมสารเข้าไป ความแม่นยำของวิธีได้รับการยืนยันจากการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละระดับ

ความเที่ยงตรง (Precision)

ความเที่ยงตรงของวิธีการได้รับการประเมินโดยการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ (repeatability) ผ่านการฉีดตัวอย่างต่อเนื่อง 3 ครั้งในวันเดียวกัน ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง สำหรับการประเมิน ความเที่ยงตรงระหว่างวัน (intermediate precision) ได้ทำการฉีดตัวอย่าง 3 ครั้งในวันต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นระดับเดียวกัน ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของเปอร์เซ็นต์การกู้คืนเฉลี่ย ถูกนำมาใช้ในการประเมินความเที่ยงตรงของวิธีนี้

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total Phenolic Content: TPC) วิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Folin-Ciocalteu ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับเมทริกซ์ของตัวอย่าง ในขั้นตอนนี้ สารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรรวมของสารผสมให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นบ่มสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที เพื่อให้การเกิดสีสมบูรณ์ ต่อมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เทียบกับ blank โดยสร้างกราฟมาตรฐานของ gallic acid ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10 ถึง 40 ไมโครโมลาร์ และแสดงค่าผลการวิเคราะห์ TPC เป็น $\text{mg GAE/g dried weight}$ ตัวอย่างแต่ละชุดถูกวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อความน่าเชื่อถือทางสถิติ

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content: TFC) โดยทำการดัดแปลงจาก colorimetric method สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) ที่ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถูกเติมลงในสารสกัดตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทำการผสมด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้สารละลายผสมกันอย่างสม่ำเสมอหลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เทียบกับ blank เพื่อหาความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ โดยสร้างกราฟมาตรฐานจาก quercetin ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 15 ถึง 80 ไมโครโมลาร์ ค่าผลลัพธ์ของ TFC แสดงเป็น $\text{mg QE/g dried weight}$ การวิเคราะห์ทั้งหมดดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูล

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเถาวัลย์เปรียง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

โดยเติมสารสกัด 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย DPPH ในเอทานอล (ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าผสมเพื่อให้สารทำปฏิกิริยากันอย่างทั่วถึง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้ตัวควบคุมเป็น DPPH ที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่ไม่มีสารสกัดผสม

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging Activity; RSA) ถูกคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนแปลงสีของ DPPH ตามสมการต่อไปนี้

$$RSA (\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$$

โดยที่ A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) ถูกคำนวณโดยใช้การ linear regression analysis เพื่อแสดงความสามารถต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ทุกชุดตัวอย่างถูกทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อความน่าเชื่อถือและความแม่นยำของข้อมูล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ได้เตรียมสารละลายปฏิกิริยา FRAP (working solution) ใหม่ โดยประกอบด้วย บัฟเฟอร์อะซีเตต 300 มิลลิโมลาร์ ประกอบด้วย C₂H₃NaO₂·3H₂O ปริมาณ 3.1 กรัม และ CH₃COOH ปริมาณ 16 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ที่ 3.6 สารละลาย TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย เฟอริกคลอไรด์ (FeCl₃·6H₂O) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO₄) เป็นสารมาตรฐาน

ในการวิเคราะห์ นำสารละลายตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน Fe-TPTZ ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะถูกแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานของ FeSO₄ (μg/mL) และแสดงผลในรูป μg/mL FeSO₄/g dried weight

การคำนวณด้วยทฤษฎีฟังก์ชันความหนาแน่น (DFT)

การวิจัยนี้ใช้ซอฟต์แวร์ Avogadro ในการสร้างโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้น (Hanwell et al., 2012) จากนั้นได้ทำการปรับค่าพิกัด xyz ให้เหมาะสม (optimized xyz coordinates)

และนำค่าพิกัดเหล่านี้มาใช้ในการเตรียมไฟล์อินพุตของ Orca (.inp) โดยใช้วิธี restricted Hartree-Fock (RHF) ร่วมกับชุด def2-SVP

จากนั้นทำการรัน Orca (Neese, 2022) กับไฟล์อินพุตดังกล่าว โดยเปิด Command Prompt แบบผู้ดูแลระบบ (Administrator Command Prompt) เปลี่ยนไดเรกทอรีไปยังที่เก็บไฟล์ .inp และในกรณีที่ทำได้ทำการเพิ่ม Orca ไว้ในตัวแปรระบบ (system PATH variable) แล้วสามารถใช้คำสั่งดังนี้

```
C:\Users\WeerasakSamee>cd C:\Users\WeerasakSamee\Orbital\Genistein
C:\Users\WeerasakSamee\Orbital\Genistein> C:\Users\WeerasakSamee\Orca\Orca.exe .\Genistein.inp > Genistein.out
C:\Users\WeerasakSamee\Orbital\Genistein> C:\Users\WeerasakSamee\Orca\Orca_2mkl Genistein -molden
Reading the input file Genistein.gbw ... done
Writing the output file Genistein.molden.input ... done
C:\Users\WeerasakSamee\Orbital\Genistein>
```

ภาพประกอบ 2 system PATH variable

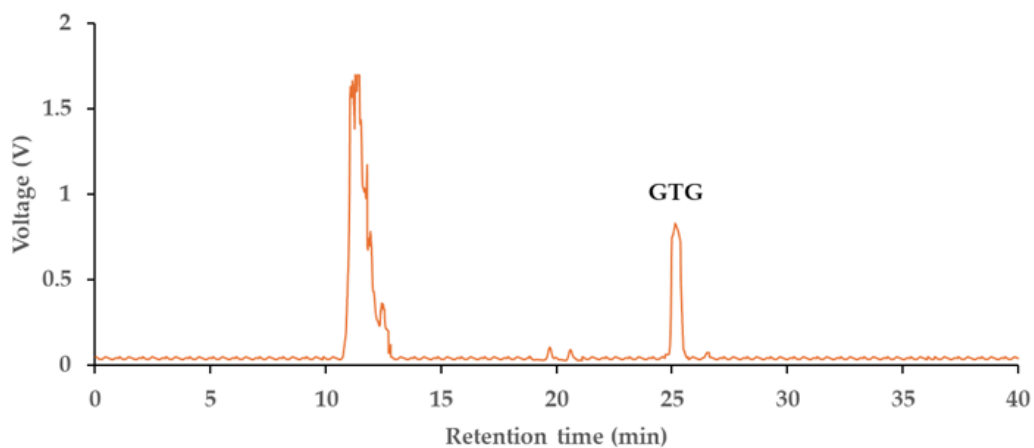
ไฟล์ Molden ถูกนำมาแสดงผลด้วยซอฟต์แวร์ IboView (เวอร์ชัน 20211019) (Knizia) ซึ่งถูกใช้ในการคำนวณ Intrinsic Bond Orbital (IBO) รวมทั้งใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างเรขาคณิตของโมเลกุลและการแสดงผลของออร์บิทัลเชิงโมเลกุล (Molecular Orbital: MO)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเตรียม GTG ของเถาวัลย์เปรียงในห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากสาร GTG ยังไม่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ดังนั้น การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาร GTG จึงต้องมีการสกัดและแยกสารจากพืชที่มีปริมาณ GTG สูง จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า GTG เป็นสารสำคัญหลักที่พบในการสกัดด้วยน้ำจากเถาวัลย์เปรียง (Sae-Foo, 2024) ในการศึกษาสาร GTG สกัดจากลำต้นของเถาวัลย์เปรียง โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จากนั้นใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวแยกสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำออกจากสารสกัดน้ำ ส่วนของสารที่สกัดด้วยน้ำจะถูกทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยแห้ง แล้วนำไปแยกสาร GTG โดยใช้เทคนิค semi-preparative HPLC โครมาโทแกรมที่ได้แสดงไว้ภาพประกอบ 3 สารออกมาในช่วงเวลา 24.8 ถึง 26.2 นาที ถูกเก็บรวบรวมและระเหยตัวทำละลายออกเพื่อเตรียมสาร GTG ภายในห้องปฏิบัติการสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพประกอบ 3 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย Semi-preparative HPLC เถาวัลย์เปรียง ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ GTG ในเถาวัลย์เปรียง

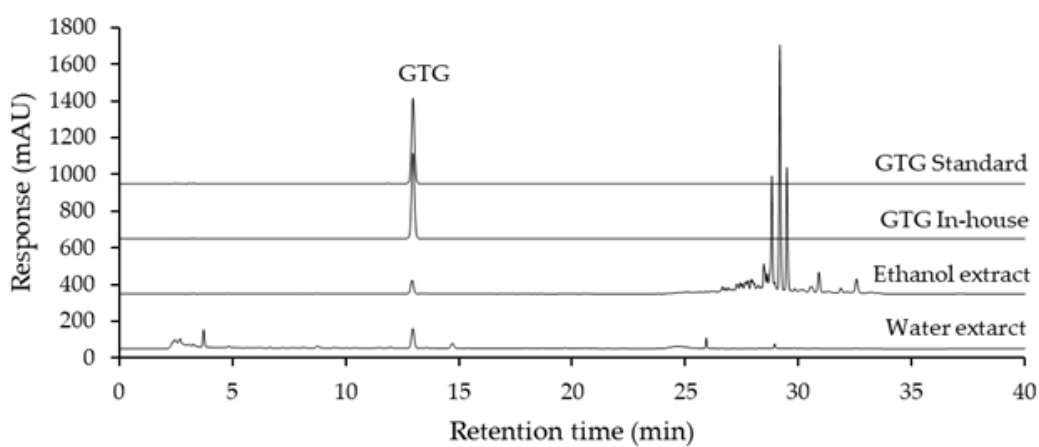
เพื่อระบุสาร GTG ที่เตรียมขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ (in-house GTG) และสาร GTG ในเถาวัลย์เปรียง ได้มีการใช้เทคนิควิเคราะห์หลายวิธี ได้แก่ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจจับแบบโฟโตไดโอดแอเรย์ (HPLC-PDA) การวิเคราะห์สเปกตรัมรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และโครมาโทกราฟีของเหลวร่วมกับแมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS)

โดยสารมาตรฐาน GTG ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ ภูตะลุน จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย (Braga et al., 2020) ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC-PDA ที่แสดงในภาพประกอบ 4A พบว่า พีคของ GTG จากสารมาตรฐาน GTG

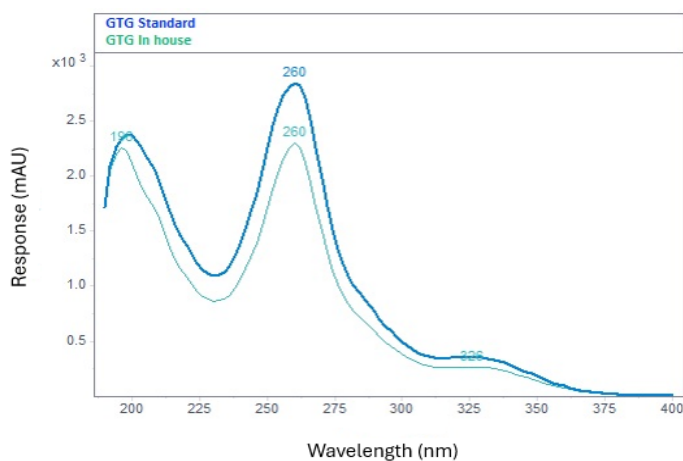
สารสกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดด้วยน้ำ มี retention time ตรงกันที่ 12.95 นาที แสดงว่าสารดังกล่าวเป็นชนิดเดียวกัน

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยสเปกตรัม UV ตามที่แสดงในภาพประกอบ 4B พบว่าสาร GTG ที่เตรียมขึ้นและสารมาตรฐาน GTG แสดงรูปแบบการดูดกลืนแสงเหมือนกัน โดยมีค่าการดูดกลืนสูงสุด ($\lambda_{\max}$) ที่ 260 นาโนเมตร

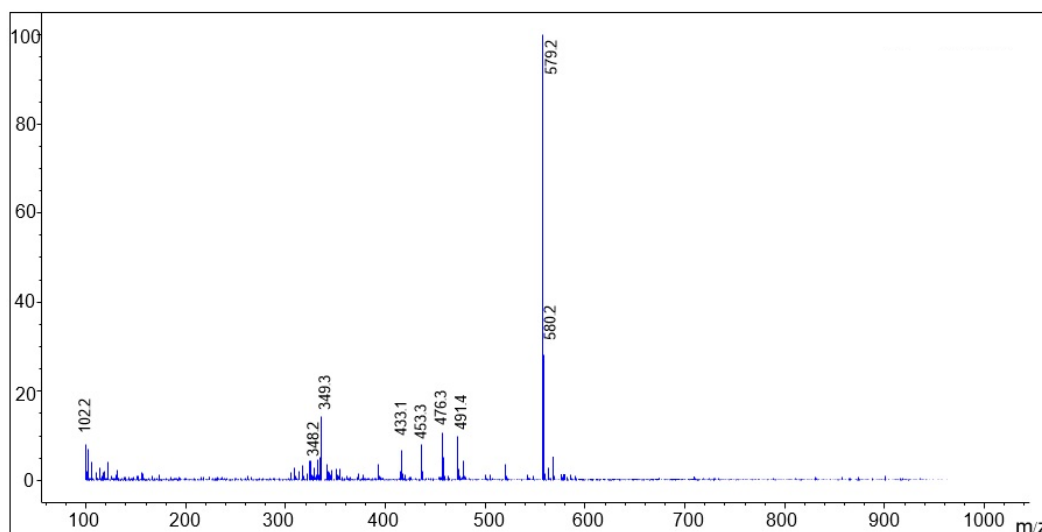
นอกจากนี้ การวิเคราะห์ด้วย LC-MS ยังตรวจพบไอออนที่เกิดจากการแตกตัวของโมเลกุล (m/z) เท่ากับ 579.2 ในโหมดประจุบวก (positive ion mode) ตามที่แสดงในภาพประกอบ 4C ซึ่งสอดคล้องกับมวลโมเลกุลของสาร GTG คือ 578 Da. ตามที่รายงานโดย (Sae-Foo, 2024)



(A)



(B)



(C)

ภาพประกอบ 4 (A) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน GTG ตัวอย่าง GTG ที่เตรียมขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ และสารสกัดเอทานอลและน้ำจากเถาวัลย์เปรียงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้ UV detection (B) สเปกตรัมรังสีอัลตราไวโอเล็ตของ GTG (C) สเปกตรัมมวลของสาร GTG ที่เตรียมขึ้นภายในห้องปฏิบัติการในโหมดประจุบวก (positive mode)

การเลือกตัวทำละลายสำหรับการสกัด GTG ในเถาวัลย์เปรียง

การสกัดสาร GTG จากเถาวัลย์เปรียง ต้องมีการเลือกตัวทำละลายเพื่อให้ได้ผลที่ดีที่สุด ขณะเดียวกันก็ต้องลดความเป็นพิษให้น้อยที่สุด รวมถึงคำนึงถึงปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและความยั่งยืนในการใช้ตัวทำละลาย ด้วยหลายปัจจัยมีผลต่อกระบวนการคัดเลือกตัวทำละลาย เช่น ความมีขั้วของสาร GTG ประสิทธิภาพของวิธีการสกัดที่ใช้ หรือสมบัติทางเคมีของตัวทำละลายที่อาจใช้ในการสกัดครั้งนี้ ใช้อัตราส่วนของเอทานอลและน้ำในหลายอัตราส่วน ร่วมกับวิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic extraction method)

Hansen Solubility Parameter (HSP) เป็นแบบจำลองที่พิจารณาแรงระหว่างโมเลกุล 3 ชนิด ได้แก่ dispersion forces (δ_d), polarity (δ_p) และ hydrogen bonding (δ_h) ซึ่งช่วยอธิบายความสามารถของตัวทำละลายในการละลายสาร GTG ของลักษณะทางโมเลกุลของสาร จากตาราง 4 พบค่า δ_d , δ_p และ δ_h ที่คำนวณของสาร GTG เท่ากับ 19.8610, 12.2874 และ 35.5022 ตามลำดับ

ตาราง 4 การทำนายค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameters)
ของสาร GTG

Group	Ni	Ci			(NiCi)d	(NiCi)p	(NiCi)h
1 st -order		δD	δP	δH			
CH ₃	1	-0.9714	-	-0.7813	-0.9714	-1.6448	-0.7813
			1.6448				
CH ₂	1	-0.0269	-	-0.4119	-0.0269	-0.3045	-0.4119
			0.3045				
CH	4	0.6450	0.6491	-0.2018	2.5800	2.5964	-0.8072
>CHOH	6	0.1123	0.2564	-0.1928	0.6738	1.5384	-1.1568
ACOH	2	0.5288	1.1010	6.9580	1.0576	2.2020	13.9160
AC	2	0.8446	0.6187	0.0084	1.6892	1.2374	0.0168
ACH	6	0.1105	-	-0.4305	0.6630	-3.1818	-2.5830
			0.5303				
-CH=C<	1	0.5372	-	-1.8872	0.5372	-0.9024	-1.8872
			0.9024				
>C=C<	1	0.3592	1.0526	-15.4659	0.3592	1.0526	-
							15.4659
>C=O	1	-0.4343	0.7905	1.8147	-0.4343	0.7905	1.8147
OH	4	-0.3462	1.1404	7.1908	-1.3848	4.5616	28.7632
O	5	0.0472	3.3432	0.9256	0.2360	16.7160	4.6280
			$\Sigma NiCi$		4.9786	24.6614	26.0454
Group	Mj	Dj			(MiDi)d	(MiDi)p	(MiDi)h
2 nd -order		δD	δP	δH			
AC-O-C	2	0.2568	0.8153	0.6092	0.5136	1.6306	1.2184
ring of 6 carbon	2	-0.3874	-	0.0000	-0.7748	-7.2864	0.0000
			3.6432				
ring of 5 carbon	3	-0.6681	-	-0.3079	-2.0043	-7.0290	-0.9237
			2.3430				
cyclic-OH	2	-0.0876	-	0.5914	-0.1752	-7.0440	1.1828
			3.5220				
			$\Sigma MiDj$		-2.4407	-19.7288	1.4775
		$\Sigma NiCi$			4.9786	24.6614	26.0454

ΣMiDj	-2.4407	-19.7288	1.4775
Constant (C)	17.3231	7.3548	7.9793
$\Sigma \text{NiCi} + \Sigma \text{MiDj} + C$	19.8610	12.2874	35.5022

ค่ารัศมี (Ra) ระหว่างพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนของสารตัวถูกละลาย (GTG) และตัวทำละลาย เป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสาร GTG จากเถาวัลย์เปรียง ค่า Ra นี้ช่วยชี้ให้เห็นถึงความเข้ากันได้ของสารกับตัวทำละลาย โดยอิงจากพารามิเตอร์แรงกระจาย ความมีขั้ว และพันธะไฮโดรเจน โดยค่า Ra ที่ต่ำ หมายถึง ความสามารถในการละลายร่วมกันที่สูงขึ้น และแรงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลที่แข็งแรงยิ่งขึ้นระหว่างสารกับตัวทำละลาย (Jeon et al., 2025) จากตาราง 5 ค่า Ra ระหว่าง GTG กับน้ำ เท่ากับ 19.45 GTG กับเอทานอล เท่ากับ 20.07 ในขณะที่ตัวทำละลายผสมมีค่า Ra ต่ำกว่าตัวทำละลายเดี่ยว ได้แก่ เอทานอล 80% เท่ากับ 17.46 เอทานอล 60% เท่ากับ 15.91 เอทานอล 50% เท่ากับ 15.60 เอทานอล 40% เท่ากับ 15.74 และ เอทานอล 20% เท่ากับ 16.98 ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าสาร GTG มีความสามารถในการละลายได้ดีที่สุดในเอทานอล 50% ซึ่งสามารถอธิบายได้จากค่า Ra ที่ต่ำที่สุดในกลุ่มตัวทำละลายน้ำกับเอทานอล

ตาราง 5 ค่ารัศมี (Ra) ที่คำนวณได้จากค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (HSP) ของ GTG กับตัวทำละลายเอทานอล-น้ำ

Name	Hansen Solubility Parameters			Ra
Solute	δD	δP	δH	
GTG	19.8610	12.2874	35.5022	
Solvent				
100% Ethanol	15.8	8.8	19.4	20.07
80% Ethanol	15.76	10.24	23.98	17.46
60% Ethanol	15.72	11.68	28.56	15.91
50% Ethanol	15.74	12.40	30.85	15.60
40% Ethanol	15.68	13.12	33.14	15.74
20% Ethanol	15.64	14.56	37.72	16.98
0% Ethanol	15.5	16	42.3	19.45

การวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สำหรับการหาปริมาณ GTG ในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง

วิธีการวิเคราะห์ GTG ในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง ได้รับการพัฒนา retention time สำหรับ GTG อยู่ที่ 12.95 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 4A วิธีการวิเคราะห์นี้อยู่ภายใต้การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability testing) และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดโดย International Council for Harmonisation (ICH) (Guideline, 2022) และแนวทางของ AOAC 2016 (Paez et al., 2016) การวิเคราะห์สารสกัดเถาวัลย์เปรียง 20% จากเถาวัลย์เปรียง ทำซ้ำ 6 ครั้ง ภายใต้สภาวะโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดย injection volume 10 ไมโครลิตร ความเหมาะสมของระบบสำหรับ GTG ได้รับการยืนยันว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของเวลาการเก็บรักษาและพื้นที่พีค (peak area) น้อยกว่า 2% การฉีดแต่ละครั้งให้ค่า column efficiency มากกว่า 2,500 โดยมีค่า tailing factor น้อยกว่า ± 1.01 จำนวน theoretical plates ทำหน้าที่เป็นมาตรวัดโดยตรงของประสิทธิภาพคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยจำนวน theoretical plates ที่สูงขึ้นบ่งชี้ถึงการแยกที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่งผลให้พีคมีความคมชัดและมีรูปร่างที่ดีขึ้นในระหว่างการวิเคราะห์ นอกจากนี้ ค่า resolution ที่ได้นั้นมากกว่า 2.0 ผลการวิจัยยืนยันว่าวิธีดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่ระบุไว้ในแนวทางของ ICH ดังแสดงในตาราง 6 รายละเอียดผลการตรวจสอบ ความถูกต้องของวิธีนำเสนอในตาราง 7 ดังนี้

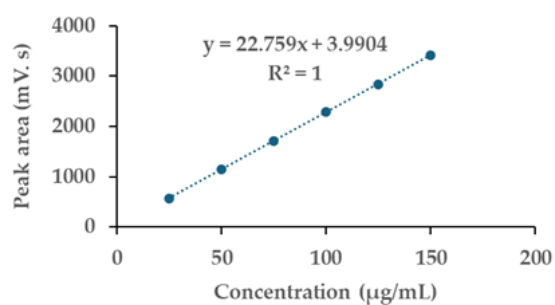
Linearity (ความเป็นเชิงเส้น) กราฟเทียบของสาร GTG แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 25 ถึง 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 1 (ภาพประกอบ 5) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ขั้นต่ำที่ต้องมากกว่า 0.995

Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) จากสมการเชิงเส้น พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y (y-intercept) เท่ากับ 2.690 และค่าความชันเฉลี่ยของสมการ เท่ากับ 22.759 ดังนั้น ค่าความเข้มข้นของ LOD และ LOQ คำนวณได้เป็น 0.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 1.18 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Accuracy (ความแม่นยำ) ค่า %recovery เฉลี่ยของสารมาตรฐาน GTG ที่ความเข้มข้น 40, 80 และ 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่ากับ 98.90%, 99.21% และ 99.10% ตามลำดับ โดยค่า %recovery ทั้งหมดอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ที่ 95% ถึง 105% ตามแนวทางของ AOAC Guideline 2016

Precision (ความเที่ยงตรง) ผลการศึกษาพบว่า ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) สำหรับความสามารถในการทำซ้ำภายในวันเดียว (intra-day repeatability) อยู่ในช่วง 0.48% ถึง 1.93% ส่วน %RSD ของความเที่ยงตรงระหว่างวัน (inter-day intermediate precision) อยู่ในช่วง 0.76% ถึง 1.30% ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ ไม่เกิน 3.7% ตามแนวทางของ AOAC Guideline 2016

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) แสดงให้เห็นว่า วิธีการที่พัฒนาขึ้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ใน AOAC Guideline 2016 ตามรายละเอียดในตาราง 7



ภาพประกอบ 4 กราฟมาตรฐานของ GTG

ตาราง 6 ผลการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

Parameters	% RSD of Retention time	% RSD of Peak area	Resolution	Number of Theoretical plate	Tailing factor
Acceptance criteria	$\leq 2\%$	$\leq 2\%$	> 2	2500	± 1.2
Results	0.15	1.57	3.12	25,423	± 1.01

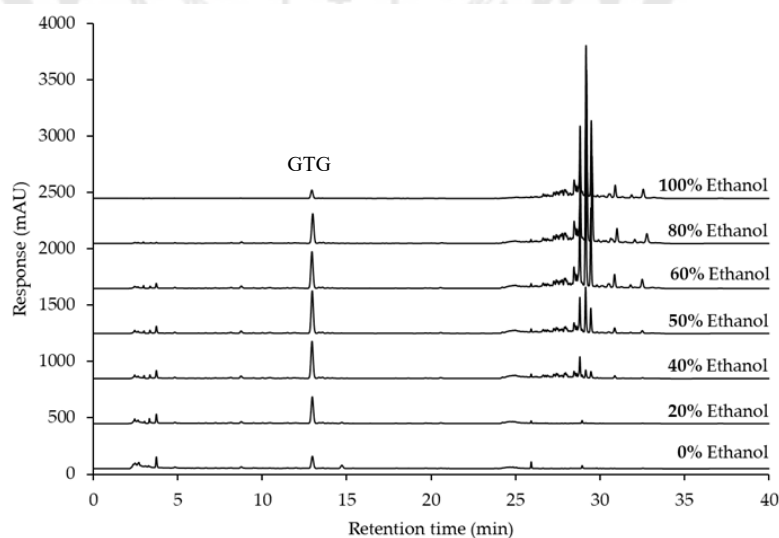
ตาราง 7 ผลการตรวจสอบความเที่ยงตรงและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

Linearity	Linear Equation	R^2	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
	$Y = 22.783X + 5.213$	0.9999		
	$Y = 22.796X + 5.852$	0.9999	0.39	1.18
	$Y = 22.697X + 0.906$	0.9999		
mean	$Y = 22.759X + 3.990$	1		

Day	Concentration (µg/mL)		%Recovery	Mean recovery	SD	%RSD
	Actual	Found				
1	40	39.87	99.67	98.90	0.7417	0.75
	40	39.53	98.83			
	40	39.28	98.20			
	80	79.97	99.96	99.21	0.7175	0.72
	80	78.82	98.53			
	80	79.31	99.14			
	120	119.66	99.71	99.10	0.5719	0.58
	120	118.82	99.02			
	120	118.30	98.58			
2	40	39.94	99.85	98.61	1.4872	1.51
	40	39.61	99.02			
	40	38.78	96.96			
	80	79.68	99.59	99.68	0.6894	0.69
	80	79.22	99.03			
	80	80.32	100.40			
	120	118.31	98.59	98.46	0.6947	0.71
	120	118.90	99.09			
	120	117.26	97.71			
3	40	39.18	97.95	98.32	1.8939	1.93
	40	40.15	100.37			
	40	38.65	96.63			
	80	79.13	98.91	98.46	0.4691	0.48
	80	78.79	98.49			
	80	78.38	97.98			
	120	117.67	98.06	98.15	0.8601	0.88
	120	118.86	99.05			
	120	116.80	97.34			
Inter-Day (n = 9)	Concentration (µg/mL)		Mean recovery	SD	%RSD	
	40					
	80					
	120					

ตราความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ GTG ที่สกัดได้กับพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameters) และค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric Constants)

การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic-Assisted Extraction: UAE) โดยใช้ระบบตัวทำละลายน้ำกับเอทานอล (aqueous-ethanol solvent systems) ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น GTG ในเชิงเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงช่วยเพิ่มอัตราการสกัด (extraction kinetics) ผ่านการเกิดฟองโพรงอากาศ (cavitation bubbles) ซึ่งทำให้น้ำเซลล์ของพืชแตก ส่งผลให้ GTG สามารถละลายและถูกสกัดออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Şahin et al., 2016) เทคนิคการสกัดนี้อาศัยพลังงานคลื่นเสียงและอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มทั้งปริมาณผลผลิตและประสิทธิภาพการสกัด ในการศึกษา การสกัด GTG จากเถาวัลย์เปรียง โดยใช้ตัวทำละลายน้ำกับเอทานอลได้ถูกออกแบบอย่างเป็นระบบ เพื่อเพิ่มปริมาณสาร GTG ที่สกัดได้ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำและเอทานอลหลายอัตราส่วนเป็นตัวทำละลายในกระบวนการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง จากภาพประกอบ 4A และภาพประกอบ 6 พบว่า retention time ของ GTG อยู่ที่ประมาณ 12.95 นาที โดยตรวจพบสัญญาณของสารที่มีขั้ว (polar compounds) ในช่วงเวลาคงอยู่ต่ำกว่า 5 นาที ในสารสกัดที่มีเอทานอล 0% ถึง 60% ในทางกลับกัน สารที่ไม่มีขั้ว (non-polar compounds) พบในช่วงเวลาคงอยู่ที่มากกว่า 25 นาที จากสารสกัดที่มีเอทานอล 40% ถึง 100% จากรายงานของ Sukhonthasilakun et al. (2023) พบว่า การสกัดด้วยเอทานอล 95% ให้ผลผลิตของสาร lupalbigenin และ isoflavones อื่น ๆ ในปริมาณที่สูงกว่า (Sukhonthasilakun et al., 2023)



ภาพประกอบ 5 โครมาโทแกรมของสารสกัดเอทานอล-น้ำ จากเถาวัลย์เปรียงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้ UV detection

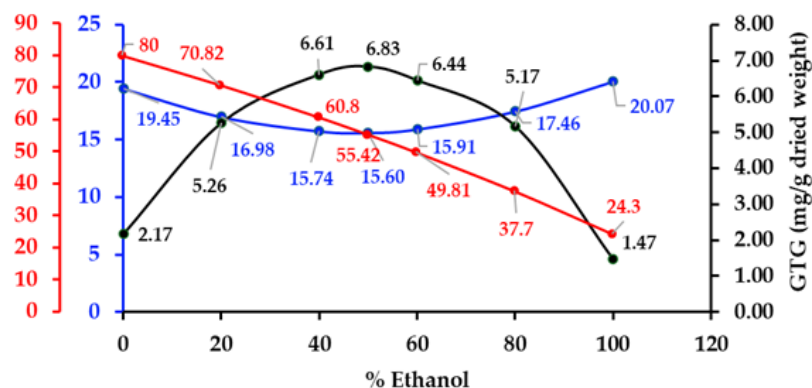
จากข้อมูลที่แสดงในตาราง 8 พบความเข้มข้นของสาร GTG สูงที่สุดในสารสกัดเอทานอล 50% ขณะที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดพบในสารสกัดเอทานอล 100% ผลการทดลองแสดงถึงตัวทำละลายผสมน้ำและเอทานอล (aqueous-ethanol) มีความเหมาะสมในสำหรับการสกัดสาร GTG จากเถาวัลย์เปรียง ดังนั้น การประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (UAE) ร่วมกับระบบตัวทำละลายเอทานอลกับน้ำ จึงเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการสกัด GTG จากเถาวัลย์เปรียง ความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างปริมาณของสาร GTG และรัศมีของพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Ra) มีพื้นฐานมาจากหลักการ ความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับระดับความใกล้เคียงกันระหว่างพารามิเตอร์การละลายของ GTG และตัวทำละลาย ในบริบทนี้ พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนถูกใช้เป็นกรอบการวิเคราะห์แบบสามมิติ เพื่อทำนายความสามารถในการละลายของสาร การเลือกใช้ตัวทำละลายน้ำและเอทานอลมีวัตถุประสงค์เพื่อลดค่ารัศมี (Ra) ให้น้อยที่สุด โดยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดต้องมีค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนที่ใกล้เคียงกับค่าของ GTG มากที่สุด จากข้อมูลในตาราง 8 และภาพประกอบ 7 พบว่า ปริมาณของ GTG ที่ได้จากการสกัดมีความสัมพันธ์กับค่ารัศมี (Ra) ที่ต่ำกว่า พบว่า เอทานอล 50% ซึ่งมีค่า Ra ต่ำที่สุด อยู่ที่ 15.60 มีปริมาณสาร GTG สูงที่สุด คือ 6.83 ± 0.06 mg/g dried weight ในขณะที่เอทานอล 100% ซึ่งมีค่า Ra สูงที่สุด อยู่ที่ 20.07 มีปริมาณสาร GTG ต่ำที่สุด คือ 1.47 ± 0.02 mg/g dried weight

ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า พารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสาร GTG จากเถาวัลย์เปรียง

ตาราง 8 รัศมีของพารามิเตอร์การละลายแฮนเซน (Ra) ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constants) และปริมาณ GTG ในตัวทำละลายต่าง ๆ (จำนวนตัวอย่าง n = 3)

Solvents	Ra	Dielectric constant (ϵ)	GTG contents (mg/g dried weight) *
100% Ethanol	20.07	24.30	1.47 ± 0.02
80% Ethanol	17.46	37.70	5.17 ± 0.09
60% Ethanol	15.91	49.81	6.44 ± 0.09
50% Ethanol	15.60	55.42	6.83 ± 0.06
40% Ethanol	15.74	60.80	6.61 ± 0.08
20% Ethanol	16.98	70.82	5.26 ± 0.12
0% Ethanol	19.45	80.00	2.17 ± 0.11

*ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างตัวทำละลาย ($p < 0.05$) ถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA)



ภาพประกอบ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ GTG ที่สกัดได้กับพารามิเตอร์
ความละลาย Hansen และค่าคงที่ไดโอดีทริก

ค่าคงที่ไดโอดีทริกของระบบตัวทำละลายผสมน้ำกับเอทานอล ตามที่แสดงในตาราง 8 และภาพประกอบ 7 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณการสกัด GTG สูงสุดเกิดขึ้นในช่วงค่าคงที่ไดโอดีทริก ระหว่าง 50 ถึง 60 ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง 40% ถึง 60% โดย GTG เป็นสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หลายตำแหน่งและมีแกนโครงสร้างแบบอะไกลโคน (aglycone nucleus) ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติความมีขั้วที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งแบบมีขั้วและไม่มีขั้วกับตัวทำละลายในตัวทำละลายผสม ค่าไดโอดีทริกโดยรวมจะได้รับอิทธิพลจากอัตราส่วนระหว่างเอทานอลกับน้ำ โดยน้ำมีค่าคงที่ไดโอดีทริกสูงประมาณ 80 ในขณะที่เอทานอลมีค่าต่ำกว่ามาก อยู่ที่ประมาณ 24.30 ส่งผลให้ระบบผสมมีค่าไดโอดีทริกระดับกลาง ซึ่งสามารถทำให้ได้ใกล้เคียงกับความมีขั้วของ GTG ดังนั้น การปรับสัดส่วนของน้ำกับเอทานอลให้เหมาะสม จึงช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของ GTG และส่งเสริมประสิทธิภาพในการสกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเถาวัลย์เปรียง

ข้อมูลสรุปในตาราง 9 เป็นการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งแสดงผลเป็น mg GAE/g โดยใช้สมการเส้นตรง $Y = 0.064X + 0.0115$ ($R^2 = 0.9999$) ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด แสดงผลเป็น mg QE/g โดยใช้สมการเส้นตรง $Y = 0.011X + 0.0061$ ($R^2 = 0.9999$) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดแต่ละตัวมีค่าอยู่ในช่วง 17.46 ± 1.65 ถึง 31.53 ± 0.61 mg GAE/g โดยพบความเข้มข้นสูงสุดในสารสกัดเอทานอล 50% ในทางเดียวกันปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีค่าอยู่ในช่วง 12.42 ± 0.40 ถึง 44.25 ± 1.08 mg QE/g โดยพบความเข้มข้นสูงสุดในสารสกัดเอทานอล 100% โดยสารสกัดเอทานอล 50% แสดงค่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับพารามิเตอร์การละลายของแชนเซนใน GTG ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณ GTG บ่งชี้ว่า GTG เป็นสารฟีนอลิกหลักที่ถูกสกัดออกมาในระบบตัวทำละลายน้ำกับเอทานอล แต่ในสารสกัดด้วยเอทานอล 100% ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของ

ฟลาโวนอยด์ชนิดอะไกลโคน เช่น Lupalbigenin (Sukhonthasilakun et al., 2023) ที่มีความสามารถในการละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยอย่างเอทานอล และไม่แสดงความสัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนของ GTG

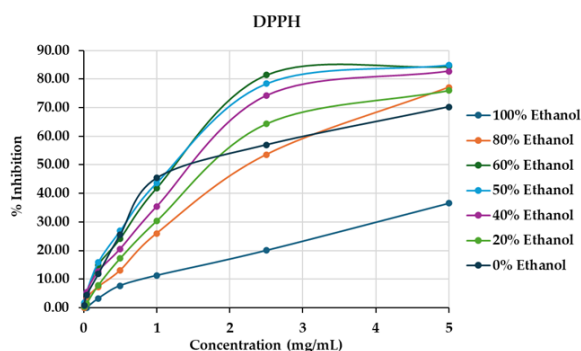
ตาราง 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content: TPC), ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content: TFC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (วัดโดยวิธี DPPH และ FRAP) ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง (n = 3)

Sample	TPC* (mgGAE/g dried weight)	TFC* (mgQE/g dried weight)	DPPH* IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP* (µg/ml FeSO ₄ /g dried weight)
100% Ethanol extract	22.44 ± 2.73	44.25 ± 1.08	6.97 ± 0.08	253.04 ± 3.47
80% Ethanol extract	28.08 ± 5.57	32.81 ± 0.20	2.30 ± 0.02	422.16 ± 34.05
60% Ethanol extract	30.39 ± 0.50	25.63 ± 2.11	1.41 ± 0.01	495.49 ± 16.72
50% Ethanol extract	31.53 ± 0.61	21.21 ± 1.24	1.43 ± 0.03	513.97 ± 26.29
40% Ethanol extract	26.58 ± 3.78	14.58 ± 0.55	1.58 ± 0.03	550.32 ± 30.71
20% Ethanol extract	17.46 ± 1.65	12.42 ± 0.40	1.88 ± 0.01	460.56 ± 29.50
0% Ethanol extract	17.99 ± 2.96	22.33 ± 1.77	1.08 ± 0.01	762.46 ± 47.95

*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวทำละลายแต่ละชนิด ($p < 0.05$) ถูกวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA)

การทดสอบด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสาร โดยกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นการให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ โดย DPPH ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นเหลือง การต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) และในการทดสอบด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) วัดความสามารถของตัวอย่างในการรีดิวซ์ไอออนเฟอริก (Fe³⁺) ให้เป็นไอออนเฟอร์รัส (Fe²⁺) โดยผลการทดสอบแสดงเป็น concentration of FeSO₄ equivalent ซึ่งค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่สูงขึ้นแสดงถึงศักยภาพในการรีดิวซ์ที่สูงขึ้น และสะท้อนถึงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

จากข้อมูลที่แสดงในภาพประกอบ 8 และตาราง 9 พบว่า สารสกัดจากน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในการทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.08 ± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในทางตรงกันข้าม สารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต่ำที่สุด เท่ากับ 6.97 ± 0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การทดสอบ FRAP พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด โดยมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ $762.46 \pm 47.95 \mu\text{g FeSO}_4/\text{g dried weight}$ ขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลมีค่าต่ำที่สุด เท่ากับ $253.04 \pm 3.47 \mu\text{g FeSO}_4/\text{g dried weight}$ สารสกัดจากตัวทำละลายผสมน้ำและเอทานอลแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH ในระดับใกล้เคียงกัน โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.41 ± 0.01 ถึง 2.30 ± 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่าความสามารถในการรีดิวซ์ (FRAP) อยู่ในช่วง 422.16 ± 34.05 ถึง $550.32 \pm 30.71 \mu\text{g FeSO}_4/\text{g dried weight}$ ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดหรือฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากเถาวัลย์เปรียงมีแนวโน้มถูกสกัดได้ดีโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (polar solvents) เป็นหลัก



ภาพประกอบ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายต่าง ๆ กับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ในการทดสอบ DPPH

ความไม่สอดคล้องกันที่เห็นได้ชัดระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ที่พบในสารสกัดน้ำกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดด้วยเอทานอล 50% และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดด้วยเอทานอล 100% นั้น บ่งชี้ว่าสารประกอบอื่น ๆ นอกจากฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ อาจมีส่วนช่วยอย่างมากต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดด้วยน้ำเป็นที่ทราบกันว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้ เช่น วิตามินบางชนิด โพลีแซคคาไรด์ และสารพฤษเคมีชนิดอื่น ๆ ที่ชอบน้ำ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยธรรมชาติ ส่วนประกอบเหล่านี้ อาจมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น ในสารสกัดด้วยน้ำเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณ GTG จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่า GTG มีส่วนช่วยในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ผลอาจเป็นเพียงบางส่วน หรือการทำงานร่วมกันอย่างเสริมฤทธิ์กับสารชีวภาพอื่น ๆ

ความสัมพันธ์ระหว่างออร์บิทัลของโมเลกุลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ GTG และสารมาตรฐาน ได้แก่ Gallic acid, Genistein, Quercetin และ Trolox

ความสัมพันธ์ระหว่าง Frontier Orbital Molecular Energies กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต่าง ๆ เป็นปัจจัยพื้นฐานในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับความไวต่อปฏิกิริยา (Reactivity) และประสิทธิภาพของ Oxidative Stress ของสาร ตัวแปรสำคัญประกอบด้วยค่าพลังงานของ Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO) และ Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO) รวมถึงค่าช่องว่างพลังงานระหว่าง HOMO และ LUMO (HOMO-LUMO energy gap หรือ ΔE)

ค่าช่องว่างพลังงาน ΔE ที่น้อย บ่งชี้ถึงความสามารถในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ง่าย ซึ่งสัมพันธ์กับศักยภาพในการให้อิเล็กตรอนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น ความเข้าใจในกลไกดังกล่าวมีความสำคัญในการอธิบายวิธีการที่สารต้านอนุมูลอิสระสามารถต่อต้านอนุมูลอิสระ และยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการออกแบบโครงสร้างสารใหม่ที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นผ่านการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมี

จากข้อมูลในตาราง 10 พบว่า quercetin มีค่า ΔE ต่ำที่สุด (9.9001 eV) สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.99 ± 0.40 ไมโครโมลาร์ จากการทดสอบ DPPH และจากการทดสอบ FRAP ค่า $FeSO_4/mM$ เท่ากับ 1399.88 ± 16.96 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในทางตรงข้าม Trolox ซึ่งมีค่า ΔE สูงที่สุด (11.1993 eV) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 66.04 ± 0.22 ไมโครโมลาร์ และค่า $FeSO_4/mM$ เท่ากับ 404.07 ± 8.94 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สำหรับ GTG พบว่าค่า ΔE ใกล้เคียงกับ genistein และ gallic acid อยู่ในช่วงระหว่าง 10.5581 ถึง 10.6715 eV โดยค่า IC_{50} อยู่ในรูปของ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu g/mL$) จะมีความแตกต่างกัน แต่เมื่อนำมาคำนวณในรูป ไมโครโมลาร์ (μM) พบว่าค่า IC_{50} ของทั้งสามสารอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน คือ ระหว่าง 57.85 ± 2.00 ถึง 64.57 ± 3.20 ไมโครโมลาร์ สำหรับค่า FRAP พบว่าอยู่ที่ 774.19 ± 10.49 , 608.09 ± 17.70 และ $623.32 \pm 12.68 \mu g/mL$ $FeSO_4/mM$ สำหรับ gallic acid, genistein และ GTG ตามลำดับ

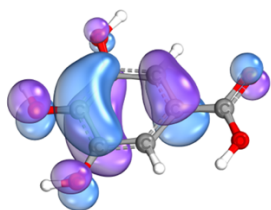
ความสัมพันธ์ในเชิงผกผันระหว่างค่า ΔE และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว ทำให้เห็นถึงความสำคัญของ Frontier Orbital Molecular Energies ในการทำนายศักยภาพในการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตาราง 10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและค่าพลังงาน HOMO และ LUMO (eV) ที่คำนวณได้ของ Gallic acid, Genistein, Quercetin และ Trolox

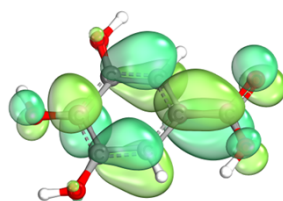
Compounds	M.W.	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ΔE (eV)	DPPH (IC ₅₀)		FRAP FeSO ₄ /mM ($\mu\text{g/ml}$)
					$\mu\text{g/ml}$	μM	
Gallic acid	170	-8.3543	2.2706	10.6249	10.54 $\pm$ 0.35	62.00 $\pm$ 2.06	774.19 $\pm$ 10.49
Genistein	270	-7.7018	2.8563	10.5581	15.62 $\pm$ 0.54	57.85 $\pm$ 2.00	608.09 $\pm$ 17.70
GTG	578	-7.9859	2.6856	10.6715	37.32 $\pm$ 1.85	64.57 $\pm$ 3.20	623.32 $\pm$ 12.68
Quercetin	302	-7.8091	2.0910	9.9001	1.81 $\pm$ 0.12	5.99 $\pm$ 0.40	1399.88 $\pm$ 16.96
Trolox	250	-7.5032	3.6961	11.1993	16.51 $\pm$ 0.22	66.04 $\pm$ 0.22	404.07 $\pm$ 8.94

Genistein และ GTG แสดงศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน โดยอ้างอิงจากค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) ในหน่วย ไมโครโมลาร์ (μM) โดยมีสาเหตุหลักมาจากโครงสร้าง aglycone ของ genistein ดังแสดงในภาพประกอบ 9 แผนภาพ Frontier Molecular Orbital ของทั้ง genistein และ GTG แสดงการกระจายตัวของวงโมเลกุลบริเวณโครงสร้าง aglycone ขณะที่ส่วนของน้ำตาลในโครงสร้าง GTG ไม่แสดงแผนภาพ Frontier Molecular Orbital บ่งชี้ว่าศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของ GTG ควบคุมโดยส่วนของ aglycone เป็นหลัก

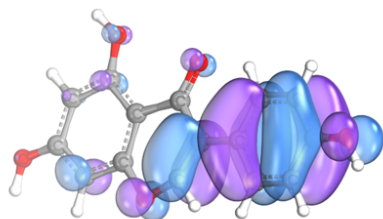
นอกจากนี้ การกระจายตัวของอิเล็กตรอนที่อิสระออกไปทั่วโครงสร้าง conjugate ซึ่งพบได้ใน quercetin และ genistein มีบทบาทสำคัญในการทำให้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีความเสถียรมากขึ้น โดยลดพลังงานของอนุมูลและเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างทางเคมี เช่น ระบบ conjugate และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) มีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสามารถลดช่องว่างพลังงานระหว่าง HOMO และ LUMO และช่วยให้อิเล็กตรอนได้อย่างมีประสิทธิภาพ และที่สำคัญหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้มีบทบาทในการเสริมสร้างศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระที่โดดเด่นของ quercetin โดยที่ Frontier Molecular Orbital กระจายไปทั่วทั้งโมเลกุล ทำให้สะท้อนถึงบทบาทสำคัญของสถาปัตยกรรมระดับโมเลกุลในการควบคุมสมบัติทางอิเล็กทรอนิกส์และสมบัติการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน



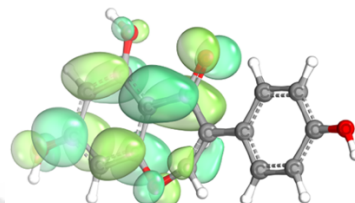
HOMO diagram of gallic acid



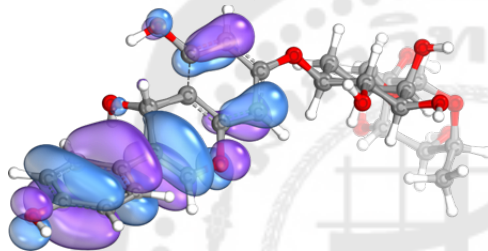
LUMO diagram of gallic acid



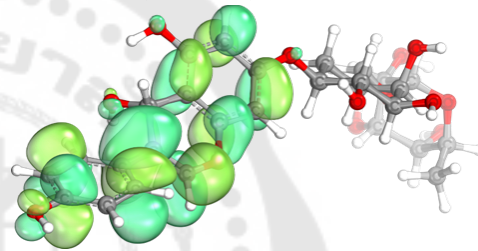
HOMO diagram of genistein



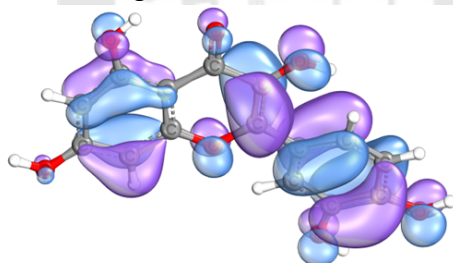
LUMO diagram of genistein



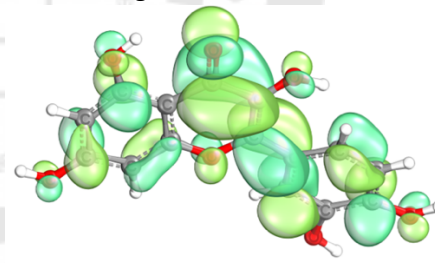
HOMO diagram of GTG



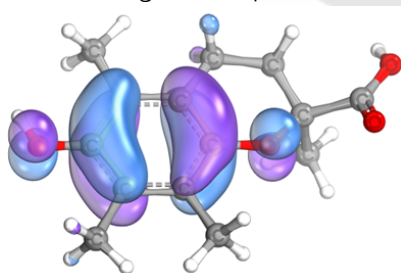
LUMO diagram of GTG



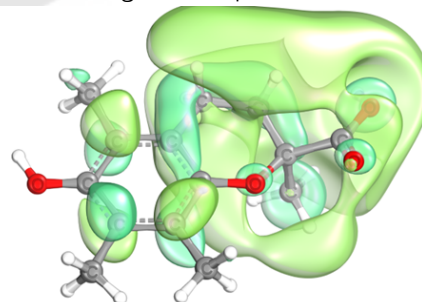
HOMO diagram of quercetin



LUMO diagram of quercetin



HOMO diagram of Trolox



LUMO diagram of Trolox

ภาพประกอบ 8 แผนภาพแสดง frontier molecular orbitals ของ gallic acid, genistein GTG, quercetin และ trolox โดยที่ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล HOMO แสดงด้วยสีม่วง/น้ำเงิน และ LUMO แสดงด้วยสีเขียวอ่อน/เขียวเข้ม

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (HSP) สามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดสารประกอบฟีนอลิก เช่น GTG ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ส่วนผสมของเอทานอลในน้ำประมาณ 40 ถึง 60% ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด ความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_a ที่ต่ำและปริมาณ GTG ที่เพิ่มขึ้นยืนยันถึงความสำคัญของความเข้ากันได้ระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลาย รวมถึงสภาพขั้ว ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลเชิงลึกจากออร์บิทัลเชิงโมเลกุล (MO) ที่อธิบายศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ออร์บิทัลเชิงโมเลกุล เผยให้เห็นว่าสารประกอบที่มีช่องว่าง HOMO - LUMO ต่ำกว่า เช่น quercetin แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ซึ่งมุ่งเน้นถึงบทบาทของคุณสมบัติทางอิเล็กทรอนิกส์ของโมเลกุลในประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าตัวทำละลายมีข้อช่วยในการเกิดพันธะไฮโดรเจนและการละลายของส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพโดยรวม การบูรณาการแนวทางพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนและออร์บิทัลเชิงโมเลกุลทำให้เกิดกรอบการทำงานที่ครอบคลุมสำหรับการปรับปรุงประสิทธิภาพการสกัดและทำความเข้าใจเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยในการพัฒนาสารพฤกษเคมีที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นและมีประโยชน์ต่อสุขภาพที่เป็นไปได้

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้เน้นถึงบทบาทสำคัญของพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameters: HSP) และออร์บิทัลเชิงโมเลกุล (Molecular Orbital: MO) ในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดและทำความเข้าใจเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Genistein-7-O- α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucopyranoside (GTG) จากเถาวัลย์เปรียง การประยุกต์ใช้วิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic-Assisted Extraction: UAE) ร่วมกับตัวทำละลายน้ำกับเอทานอล พบว่า องค์ประกอบของตัวทำละลายมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพในการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเกิดจากความสอดคล้องกันระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลายตามการทำนายโดยค่าของพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน ในการวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึง ค่า R_a ที่ต่ำกว่า โดยเฉพาะในเอทานอล 50% อยู่ที่ 15.60 มีความสัมพันธ์กับปริมาณ GTG ที่สูงขึ้น (ประมาณ 6.61 มิลลิกรัม/กรัม) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบตัวทำละลายที่มีพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนใกล้เคียงกับของ GTG จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสารได้ดี ในส่วนค่า R_a ที่สูงกว่าในเอทานอล 100% อยู่ที่ 20.07 มีความสัมพันธ์กับปริมาณ GTG ที่ลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งเน้นให้เห็นถึงความสำคัญของแบบจำลองการทำนายการละลายในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

การศึกษานี้เน้นย้ำถึงบทบาทขั้วของตัวทำละลายและค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด โดยสภาวะแวดล้อมที่มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกระดับกลาง ซึ่งเกิดจากการใช้เอทานอล 40 ถึง 60% (ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกประมาณ 50 ถึง 60)

ส่งเสริมการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลของ GTG และเพิ่มการละลายของสาร โดยผลลัพธ์สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วมักมีประสิทธิภาพดีกว่า ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ค่าพารามิเตอร์การละลายของแอสเซน จึงเป็นการวิเคราะห์ ที่เชื่อถือได้ในการปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลาย ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า ตัวทำละลายที่มีค่าพารามิเตอร์การละลายของแอสเซนเหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ของการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้อย่างมาก โดยงานวิจัยของ Jeon et al. ยังได้แสดงให้เห็นว่า ค่าพารามิเตอร์การละลายของแอสเซนสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกตัวทำละลาย ที่เหมาะสมในการสกัดสาร และเน้นถึงความเข้ากันได้ระหว่างตัวทำละลายกับตัวถูกละลาย ที่มีต่อประสิทธิภาพของการสกัด (Jeon et al., 2025)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การประเมินด้วยการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่า สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายที่มีขั้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันสูงสุด โดยเฉพาะ สารสกัดจากน้ำที่แสดงฤทธิ์สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการละลายของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่สูงกว่า โดยไม่พบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างปริมาณฟีนอลทั้งหมดกับฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยของ Mukit et al. พบว่าสารสกัดจากคลอโรฟอร์มและเอทิลอะซีเตตของ เถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจากการประเมินด้วยวิธี DPPH เช่นกัน (Mukit et al., 2024) การใช้พารามิเตอร์การละลายของแอสเซนในการสกัด GTG จากเถาวัลย์เปรียงช่วยระบุ ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายโครงสร้างเคมีเฉพาะ ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการสกัด และเสริมกระบวนการผลิตที่ยั่งยืน อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ยังไม่สามารถอธิบายการสกัดของสาร ฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์ชนิดอื่น ๆ ได้อย่างครอบคลุม การไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ GTG กับค่า TPC, TFC และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชี้ให้เห็นถึงช่องว่างของงานวิจัยที่ควรมีการศึกษา สารฟีนอลิกชนิดอื่น ฟลาโวนอยด์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่พบในเถาวัลย์เปรียง เพิ่มเติม

การศึกษาทางออร์บิทัลเชิงโมเลกุลยังเน้นถึงความสำคัญของค่าช่องว่างพลังงานระหว่าง HOMO และ LUMO (ΔE) ในการพยากรณ์ศักยภาพต้านอนุมูลอิสระ โดย Quercetin ที่มีค่า ΔE ต่ำที่สุด (9.9001 eV) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ขณะที่ Trolox ซึ่งมีค่า ΔE สูงกว่า (11.1993 eV) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า แนวโน้มเดียวกันนี้ยังพบใน Genistein และ Gallic acid ยืนยันว่ากลุ่มโมเลกุลที่มีค่า ΔE ต่ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่า การวิเคราะห์แผนภาพ FMO ชี้ให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ GTG ส่วนใหญ่เกิดจาก โครงสร้าง aglycone ซึ่งมีระบบ conjugate และหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถทำให้อนุมูลอิสระ มีเสถียรภาพผ่านการกระจายของอิเล็กตรอน การมีพลังงาน HOMO ที่สูงยังช่วยส่งเสริมการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ส่งผลให้สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น ตามที่ Ozaki et al. รายงานไว้ (Ozaki et al., 2023) นอกจากนี้ ค่า ΔE ที่ต่ำยังสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่เพิ่มขึ้น ตามการศึกษาของ Farias et al. (de Souza Farias et al., 2021)

ผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า โครงสร้างโมเลกุลที่มี conjugate เพิ่มขึ้นและมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) มากขึ้นสามารถพัฒนาให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น หมู่ไฮดรอกซิล มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความสามารถในการให้อิเล็กตรอนและทำให้อนุมูลอิสระมีเสถียรภาพ

ซึ่งเสริมฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น ทั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากงานวิจัยของ Cai et al. และ Sarian et al. (Ayameang et al., 2020; Sarian et al., 2017) กล่าวโดยสรุป จากการศึกษา FMO มีบทบาทสำคัญในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของ GTG และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมีผลต่อฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ และสามารถนำไปสู่การออกแบบสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นในอนาคต

ตามศาสตร์การแพทย์แผนไทย ตำรับแผนโบราณใช้วิธีการต้มน้ำเดือดกับสมุนไพรสำหรับรับประทานแก้อาการต่าง ๆ จึงคาดการณ์ว่าสารที่ได้รับจากการรับประทานเป็นสารกลุ่ม glycoside โดย GTG จัดเป็นสารที่มีขี้้มมากประกอบด้วยน้ำตาล 2 หมู่ ได้แก่ rhamnose และ glucose และ Thai Herbal Pharmacopoeia มีการกำหนดให้ GTG เป็น chemical marker สำหรับเกววัลย์เปรียง

จากพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน พบค่า R_a ที่น้อยที่สุดอยู่ในช่วงเอทานอล 50 ถึง 60% ซึ่งค่า R_a ที่น้อยแสดงถึงการละลายในตัวทำละลายได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง ที่ให้ปริมาณ GTG สูงที่สุด และค่า Dielectric constant ให้ปริมาณ GTG สูงสุด ในช่วงเอทานอล 50 ถึง 60% ซึ่งสอดคล้องกับพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน

ในความสัมพันธ์ของฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระกับโครงสร้าง HOMO-LUMO พบว่า ค่า ΔE ที่น้อยสัมพันธ์กับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ดี เนื่องจากบ่งชี้ถึงการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ง่าย เพื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นกลไกหลักของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสาร Quercetin มีค่า ΔE ต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ดีสุดทั้งวิธี DPPH และ FRAP โดยถึงแม้ว่า GTG จะมีค่า IC_{50} ในการทดสอบ DPPH ที่ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน แต่ FRAP value ของ GTG อยู่ในระดับที่ดีและใกล้เคียงกับ Genistein ซึ่งเป็น aglycone ของ GTG และ Gallic acid ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการรีดิวซ์ที่ดีของ GTG คุณสมบัตินี้สอดคล้องกับค่า ΔE ของ GTG ที่อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับสารมาตรฐานเหล่านั้น บ่งชี้ว่า GTG มีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกการให้อิเล็กตรอน (electron-donating capacity) โดยเฉพาะในบริบทของการรีดิวซ์ไอออนโลหะ โดยการที่โครงสร้างของ GTG เป็น glycoside อาจส่งผลต่อการเข้าถึงอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีขนาดใหญ่ ทำให้การทำปฏิกิริยาโดยตรง อาจทำได้ยากกว่าสารในรูป aglycone อย่าง Genistein หรือสารมาตรฐานอื่น ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ตำแหน่งสำคัญสำหรับการจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม หมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมากบนโครงสร้าง glycoside มีส่วนช่วยในการรีดิวซ์ที่วัดได้ด้วยวิธี FRAP

จากการทดลอง ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่า GTG ที่ใช้เป็น chemical marker ของเกววัลย์เปรียงเป็นสารออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากในการสกัดด้วยเอทานอล 50% ให้ปริมาณ GTG สูงสุด แต่ไม่ได้มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ดีสุด แต่เป็นการสกัดด้วยน้ำที่ให้ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ดีสุด ซึ่งสอดคล้องกับศาสตร์การแพทย์แผนไทยที่ใช้การต้มน้ำเดือดของสมุนไพรสำหรับการรับประทานแก้อาการต่าง ๆ จึงควรมีการศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ที่ให้ฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดต่อไป นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการคำนวณร้อยละผลได้ (%yield) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการสกัดและเปรียบเทียบกระบวนการสกัด การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เพื่อเป็นการยืนยันผลต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบความคงตัวเพื่อประเมินคุณภาพสารสกัด ทั้งในด้านคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ รวมถึงอายุการเก็บรักษาเพิ่มเติม



บรรณานุกรม

- Abdelmadjid, A., Haffar, D., Benghanem, F., Ghedjati, S., Toukal, L., Dorcet, V., & Bourzami, R. (2021). Synthesis, crystal structure, electrochemical, theoretical studies and antioxidant activities of new Schiff base. *Journal of Molecular Structure*, 1227, 129368.
- Atkins, P., de Paula, J. (2014). ((10th ed.) ed.). Oxford University Press.
- Atkins, P., Friedman, R. (2011). ((5th ed.) ed.). Oxford University Press.
- Australia Government Department of Health and Aged Care. (2023, February 9). *About active and inactive medicine ingredients*. <https://www.health.gov.au/our-work/active-ingredient-prescribing/active-and-inactive-ingredients>
- Ayameang, O., Rattarom, R., Mekjaruskul, C., & Caichompoo, W. (2020). Anti-inflammatory activity and quantitative analysis of major compounds of the mixtures of *Derris scandens* (DZSS) formula. *Pharmacognosy Journal*, 12(4).
- Barbosa-Pereira, L., Bilbao, A., Vilches, P., Angulo, I., Lluís, J., Fité, B., Paseiro-Losada, P., & Cruz, J. M. (2014). Brewery waste as a potential source of phenolic compounds: Optimization of the extraction process and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 145, 191-197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.033>
- Barton, A. F. M. (1991). ((2nd ed.) ed.). CRC Press.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Braga, L. S., Leal, D. H., Kuca, K., & Ramalho, T. C. (2020). Perspectives on the role of the frontier effective-for-reaction molecular orbital (FERMO) in the study of chemical reactivity: an updated review. *Current Organic Chemistry*, 24(3), 314-331.
- Chamchomdao, P., & Samee, W. (2020). Development of Extraction and Validation Methods for The Analysis of Emodin in *Ventilago denticulata* Srinakharinwirot University].
- de Souza Farias, S. A., da Costa, K. S., & Martins, J. B. (2021). Analysis of conformational, structural, magnetic, and electronic properties related to antioxidant activity: revisiting flavan, anthocyanidin, flavanone, flavonol, isoflavone, flavone, and flavan-3-ol. *ACS omega*, 6(13), 8908-8918.

- Deviani, V., Hardianto, A., Farabi, K., & Herlina, T. (2022). Flavanones from *Erythrina crista-galli* twigs and their antioxidant properties determined through in silico and in vitro studies. *Molecules*, 27(18), 6018.
- Galamba, N., Paiva, A., Barreiros, S., & Simoes, P. (2019). Solubility of polar and nonpolar aromatic molecules in subcritical water: the role of the dielectric constant. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(11), 6277-6293.
- Gökalp, F. (2018). An investigation of the olive phenols activity as a natural medicine. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 657-661.
- Guideline, I. (2022). Validation of analytical procedures Q2 (R2). *ICH: Geneva, Switzerland*.
- Hansen, C. M. (2007). In *Hansen solubility parameters: A user's handbook* ((2nd ed.) ed.). CRC Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781420006834](https://doi.org/10.1201/9781420006834)
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, 4, 1-17.
- Hematulin, A., Ingkaninan, K., Limpeanchob, N., & Sagan, D. (2014). Ethanolic extract from *Derris scandens* Benth mediates radiosensitization via two distinct modes of cell death in human colon cancer HT-29 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(4), 1871-1877.
- Hematulin, A., Meethang, S., Ingkaninan, K., & Sagan, D. (2012). *Derris scandens* Benth extract potentiates radioresistance of Hep-2 laryngeal cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(4), 1289-1295.
- Herrera-Pool, E., Ramos-Díaz, A. L., Padilla de la Rosa, J. D., García-Cruz, U., Lizardi-Jiménez, M. A., Ayora-Talavera, T., Cuevas-Bernardino, J. C., & Pacheco, N. (2025). UPLC-PDA-ESI-MS based chemometric analysis for solvent polarity effect evaluation on phytochemical compounds and antioxidant activity in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq) fruit extract. *Journal of Food Science*, 90(1), e17630.
- Jeon, H. J., Lee, B.-S., & Park, C. (2025). Extraction of Chlorogenic Acid Using Single and Mixed Solvents. *Molecules*, 30(3), 481.
- Knizia, G. *IboView v.20211019-RevA.:A program for chemical analysis*. Available online: <http://www.iboview.org/>
- Laupattarakasem, P., Houghton, P. J., & Houlst, J. R. S. (2004). Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. *Planta medica*, 70(06), 496-501.

- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Ginies, C., & Chemat, F. (2014). Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 724-731.
- Lin, L. Z., & Harnly, J. M. . (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4), 1084–1096. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf062931h>
- Liu, J., Li, C., Ding, G., & Quan, W. (2021). Artificial intelligence assisted ultrasonic extraction of total flavonoids from *Rosa sterilis*. *Molecules*, 26(13), 3835.
- Liu, J., Zhang, Y., Yi, C., Zhang, R., Yang, S., Liu, T., Jia, D., Yang, Q., & Peng, S. (2023). Evaluation of antioxidant properties and molecular design of lubricant antioxidants based on QSPR Model. *Lubricants*, 12(1), 3.
- Marczyński, Z., Zgoda, M. M., Stańczak, A., Nowak, S., Jambor, J., & Skibska, B. (2019). Predicted real solubility ($-\log x_2$) and the level of hydrophilic-lipophilic balance (HLB $_{\text{Requ.}}$) of phytochemicals contained in extracts isolated from linden inflorescence (*Tiliae flos*) with solvents of diversified polarity (ϵ_{M}). *Herba Polonica*, 65(3), 39-50.
- Md Yusof, A. H., Abd Gani, S. S., Zaidan, U. H., Halmi, M. I. E., & Zainudin, B. H. (2019). Optimization of an ultrasound-assisted extraction condition for flavonoid compounds from cocoa shells (*Theobroma cacao*) using response surface methodology. *Molecules*, 24(4), 711.
- Mohamed, H., Al-Hajhoj, M., Al-Saikh, M., Alqahtani, N., Zayed, M., Moawad, M., Alsenaien, W., & Mohamed, M. E. (2022). Green extraction of date palm fruits via ultrasonic-assisted approach: optimizations and antioxidant enrichments. *Processes*, 10(6), 1049.
- Morad, R., Akbari, M., & Maaza, M. (2023). Theoretical study of chemical reactivity descriptors of some repurposed drugs for COVID-19. *MRS advances*, 8(11), 656-660.
- Motsumi, P., Qwebani-Ogunleye, T., Ejidike, I., Mtunzi, F., & Nate, Z. (2020). *Teedia lucida* root extracts by ultrasonication and maceration techniques: Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activity. *Rasayan J Chem*, 13(1), 423-433.
- Mukherjee S. (2019). Chapter 2-Isolation and Purification of Industrial Enzymes: Advances in Enzyme Technology. *Advances in Enzyme Technology*, 41-67.

- Mukit, T., Ashrafi, S., Ahsan, M., & Azam, A. Z. (2024). Chemical and Biological Profiling of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. *Bangladesh Journal of Botany*, 53(2), 227-233.
- Neese, F. (2022). Software update: The ORCA program system—Version 5.0. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 12(5), e1606.
- Novaes, F. J. M., de Faria, D. C., Ferraz, F. Z., & de Aquino Neto, F. R. (2023). Hansen solubility parameters applied to the extraction of phytochemicals. *Plants*, 12(16), 3008.
- Ozaki, T., Mikami, K., Toyomaki, A., Hashimoto, N., Ito, Y. M., & Kusumi, I. (2023). Assessment of electroencephalography modification by antipsychotic drugs in patients with schizophrenia spectrum disorders using frontier orbital theory: A preliminary study. *Neuropsychopharmacology Reports*, 43(2), 177-187.
- Ozalp, L., Danış, Ö., Yuce-Dursun, B., Demir, S., Gündüz, C., & Ogan, A. (2020). Investigation of HMG-CoA reductase inhibitory and antioxidant effects of various hydroxycoumarin derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, 353(10), 1900378.
- Paez, V., Barrett, W. B., Deng, X., Diaz-Amigo, C., Fiedler, K., Fuerer, C., Hostetler, G. L., Johnson, P., Joseph, G., & Konings, E. J. (2016). AOAC SMPR® 2016.002. *Journal of AOAC International*, 99(4), 1122-1124.
- Pham, D.-C., Nguyen, H.-C., Nguyen, T.-H. L., Ho, H.-L., Trinh, T.-K., Riyaphan, J., & Weng, C.-F. (2020). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from *Celastrus hindsii* Leaves Using Response Surface Methodology and Evaluation of Their Antioxidant and Antitumor Activities. *BioMed research international*, 2020(1), 3497107.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- Pobpad. (ม.ป.ป). *Oxidative Stress* ตัวการของปัญหาสุขภาพ รู้จักกับสาเหตุและวิธีรับมือ. <https://www.pobpad.com/oxidative-stress-ตัวการของปัญหาสุขภาพ>
- Pourreza, N. (2013). Phenolic compounds as potential antioxidants. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8(4), 149-150. <https://doi.org/https://doi.org/10.17795/jjnpp-15380>
- Puttarak, P., Sawangjit, R., & Chaiyakunapruk, N. (2016). Efficacy and safety of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. for musculoskeletal pain treatment: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of ethnopharmacology*, 194, 316-323.

- Radyukova, V., Boyko, N., Zhilyakova, E., Tsvetkova, Z., Martceva, D., Malyutina, A., Kasakova, V., Fadeeva, D., & Balloul, G. (2019). Study and Modeling the Influence of a Solvent on Extraction of Eugenol from *Laurus Nobilis* L. Leaves. 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019),
- Rao, S. A., Srinivas, P. V., Tiwari, A. K., Vanka, U. M. S., Rao, R. V. S., Dasari, K. R., & Rao, M. J. (2007). Isolation, characterization and chemobiological quantification of α -glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. *Journal of chromatography B*, 855(2), 166-172.
- Sadhukhan, P., Saha, S., & Sil, P. C. (2018). An insight into the prophylactic effects of the leguminosae family plants against oxidative stress-induced pathophysiological conditions. *React. Oxyg. Species*, 6, 220-247.
- Sae-Foo, W., Nualkaew, N., Yusakul, G., & Putalun, W. (2022). Estrogenic activity of isoflavones derived from *Derris scandens* using MCF-7 cell. *Planta medica*, 88(15), P-122.
- Sae-Foo, W., Singkham, S., Srisongkham, P., Yusakul, G., Masugarut, P., & Putalun, W. (2024). Development and characterisation of highly specific monoclonal antibody-based immunoassays for the detection and quantification of genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside in *Derris scandens* (Roxb.) Benth. *Phytochemical Analysis*, 35(3), 483-492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.3305>
- Sae-Foo, W., Yusakul, G., Nualkaew, N., & Putalun, W. (2024). Estrogenic Activity of *Derris scandens* Stem Extract and its Major Compounds Using MCF-7 Cell Proliferation Assay and Estrogen-Related Gene Expression. *Planta medica*, 90(10), 766-773.
- Şahin, S., Aybastier, Ö., & Demir, C. (2016). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Quercetin and Cyanidin from *P. yracantha* Coccinea and Their Scavenging Effect on Free Radicals. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 472-479.
- Sangkaew, W., Sianglum, W., Wunnoo, S., Voravuthikunchai, S. P., & Joycharat, N. (2024). Bioactive substance contents and therapeutic potential for skin inflammation of an herbal gel containing *Derris reticulata* and *Glycyrrhiza glabra*. *Pharmaceutical Biology*, 62(1), 648-658.
- Sarian, M. N., Ahmed, Q. U., Mat So'ad, S. Z., Alhassan, A. M., Murugesu, S., Perumal, V., Syed Mohamad, S. N. A., Khatib, A., & Latip, J. (2017). Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: A structure-activity relationship based study. *BioMed research international*, 2017(1), 8386065.

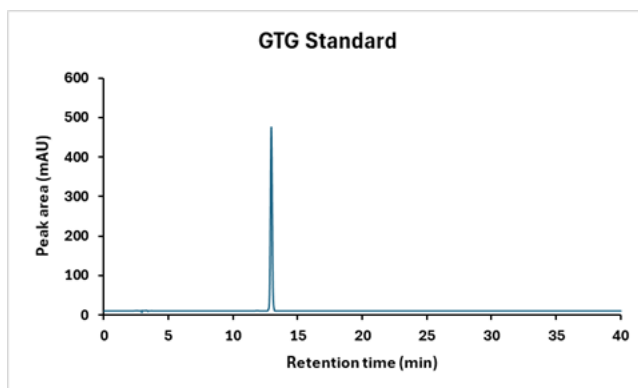
- Sarkar, A., Middy, T. R., & Jana, A. D. (2012). A QSAR study of radical scavenging antioxidant activity of a series of flavonoids using DFT based quantum chemical descriptors—the importance of group frontier electron density. *Journal of Molecular Modeling*, 18(6), 2621-2631.
- Sarkar, T., Kundu, S., & Bhattacharjee, A. (2024). Dielectric Property, AC Conductivity, and Electric Modulus Studies of Pristine and Green-Synthesized ZnO Nanoparticles. *physica status solidi (a)*, 221(5), 2300615.
- Shahriar, S., Jaman, A. U., Saha, S., Islam, M. S., Islam, M. R., Saha, B., Sikder, M. A. A., & Rashid, M. A. (2023). Comparison of antimicrobial and membrane stabilizing properties of leaf and stem extracts of *Derris scandens* (Roxb.) Benth.(Family: Fabaceae). *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 26(1), 67-72.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Soib, H. H., Ismail, H. F., Husin, F., Abu Bakar, M. H., Yaakob, H., & Sarmidi, M. R. (2020). Bioassay-guided different extraction techniques of *Carica papaya* (Linn.) leaves on in vitro wound-healing activities. *Molecules*, 25(3), 517.
- Sukhonthasilakun, S., Mahakunakorn, P., Naladta, A., Nuankaew, K., Nuankaew, S., Yenjai, C., & Nuankaew, N. (2023). Anti-inflammatory effects of *Derris scandens* extract on narrowband-ultraviolet B exposed HaCaT human keratinocytes. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 14(2), 1-10.
- Sumontri, S. E., W.; Tadtong, S.; Samee, W. (2024). Ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in commercial Suk-Saiyasna herbal remedy: applying Hansen solubility parameters for sample extraction to ensure regulatory compliance. *Pharmaceuticals*, 17, 1502.
- Tantinithiphong, T., Eiamart, W., Tadtong, S., Vorarat, S., & Samee, W. (2025). Application of Hansen Solubility Parameters in the Aqueous-Ethanol Extraction of Genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside from *Derris scandens* and Its Molecular Orbital Study on Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5740. <https://doi.org/10.3390/ijms26125740>

- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Tobgay, U. B., P.; Meunprasertdee, P. (2020). Comparison of hot water and methanol extraction combined with ultrasonic pretreatment on antioxidant properties of two pigmented rice cultivars. *Food Research*, 4, 547-556.
- Veitch, N. C. (2013). Isoflavonoids of the leguminosae. *Natural product reports*, 30(7), 988-1027.
- Wang, B.-L., Zhu, H.-W., Ma, Y., Xiong, L.-X., Li, Y.-Q., Zhao, Y., Zhang, J.-F., Chen, Y.-W., Zhou, S., & Li, Z.-M. (2013). Synthesis, insecticidal activities, and SAR studies of novel pyridylpyrazole acid derivatives based on amide bridge modification of anthranilic diamide insecticides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(23), 5483-5493.
- Wichaya Pongklam. (2563). ทำความรู้จัก ‘สารต้านอนุมูลอิสระ’ (Antioxidant) สารช่วยต่อต้านความชรา. <https://www.ofm.co.th/blog/antioxidant/>
- Xie, J., Wang, J., & Zhu, B. (2016). Genistein inhibits the proliferation of human multiple myeloma cells through suppression of nuclear factor- κ B and upregulation of microRNA-29b. *Molecular Medicine Reports*, 13(2), 1627-1632.
- Zhang, N., Wu, Y., Qiao, M., Yuan, W., Li, X., Wang, X., Sheng, J., & Zi, C. (2022). Structure–antioxidant activity relationships of dendrocandins analogues determined using density functional theory. *Structural Chemistry*, 33(3), 795-805.
- Zhang, Q., Tan, X., Wang, W., Yu, Q., Wang, Q., Miao, C., Guo, Y., Zhuang, X., & Yuan, Z. (2019). Screening solvents based on Hansen solubility parameter theory to depolymerize lignocellulosic biomass efficiently under low temperature. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(9), 8678-8686.
- คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. (ม.ป.ป.). *High Performance Liquid Chromatograph*. <https://sciins.science.kmitl.ac.th/instrument/Detail/10--hp-high-performance-liquid-chromatograph->
- บัณฑิตวรณ ธุระพระ และคณะ (2559). การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ. ว.เภสัชศาสตร์อีสาน, 11(พิเศษ), 85.
- มหาวิทยาลัยมหิดล. (2543). สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 1 สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน).
- มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. (ม.ป.ป.). การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในโครมาโทกราฟี. http://oservice.skru.ac.th/ebookft/809/chapter_5.pdf

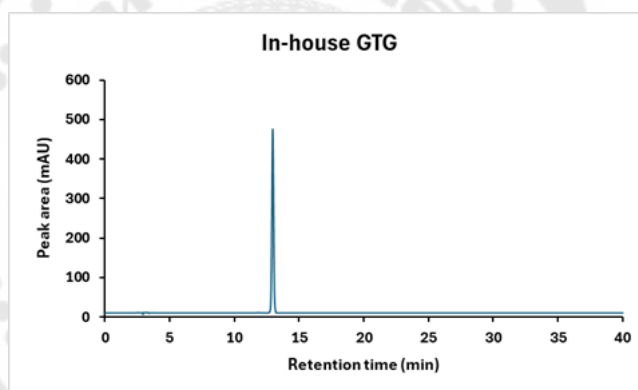
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ค. ช. (ม.ป.ป.). เถาวัลย์เปรียง .
<https://apps.phar.ubu.ac.th/thaicrudedrug/main.php?action=viewpage&pid=63>
 สุชาดา มานอก และ ปวีณา ลิ้มเจริญ. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับ ยาหอมเทพจิตร. วารสารก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์, 15(1), 106-117.
 สุภาณี ดวงธีรปรีชา. (2561). การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์. บทความวิชาการเพื่อ การศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์, 1-5.



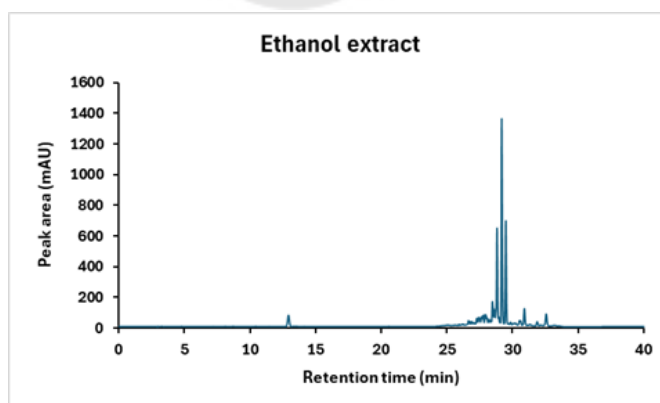
ภาคผนวก



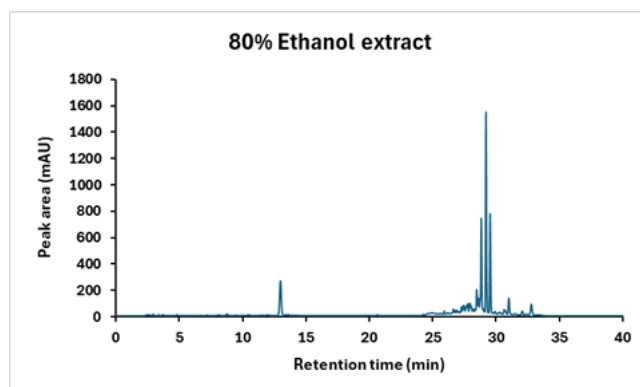
ภาพประกอบ 9 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน GTG



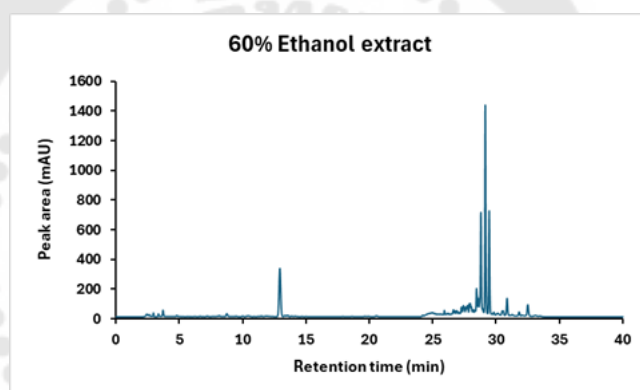
ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน in-house GTG



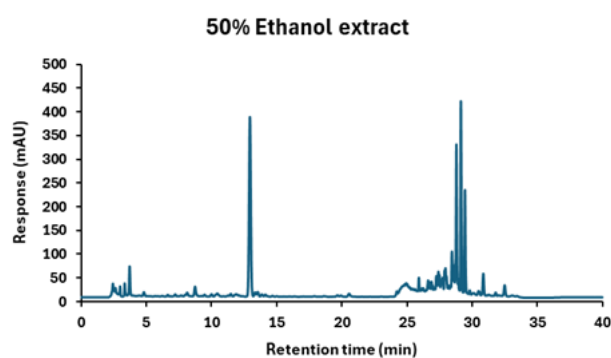
ภาพประกอบ 11 โครมาโทแกรมเถาวัลย์เปรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 100%



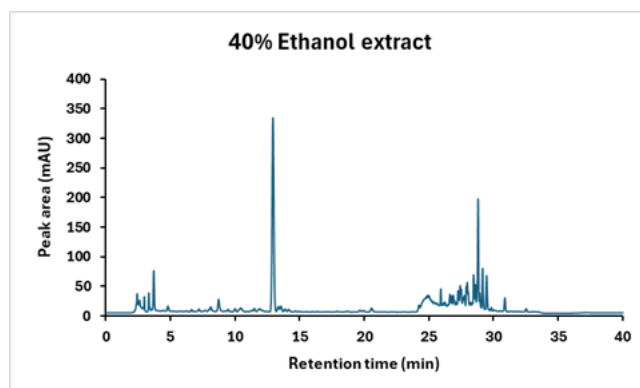
ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมแกว้ลย์เบรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80%



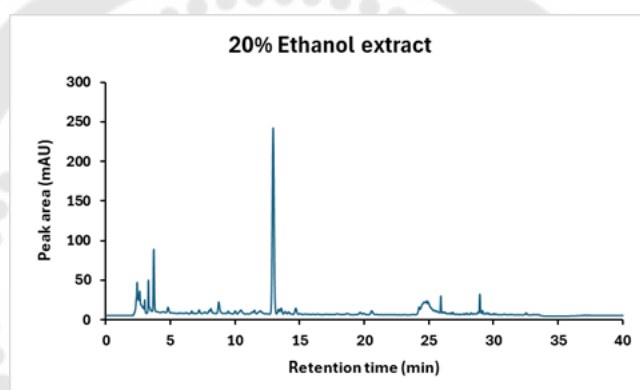
ภาพประกอบ 13 โครมาโทแกรมแกว้ลย์เบรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 60%



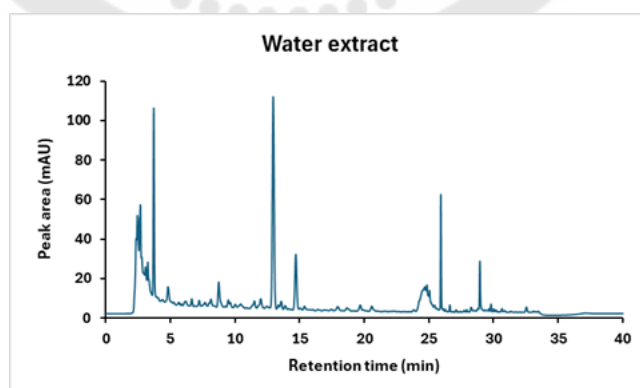
ภาพประกอบ 14 โครมาโทแกรมแกว้ลย์เบรียงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50%



ภาพประกอบ 15 โครมาโทแกรมเอทิลแอลกอฮอล์ 40% สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40%



ภาพประกอบ 16 โครมาโทแกรมเอทิลแอลกอฮอล์ 20% สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 20%



ภาพประกอบ 17 โครมาโทแกรมเอทิลแอลกอฮอล์ 0% สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ (เอทานอล 0%)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	จิตติพร ตันตินิพิงษ์
วัน เดือน ปี เกิด	-
สถานที่เกิด	-
ประวัติการศึกษา	-
ที่อยู่ปัจจุบัน	-
ผลงานตีพิมพ์	Application of Hansen Solubility Parameters in the Aqueous-Ethanol Extraction of Genistein-7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -glucopyranoside from <i>Derris scandens</i> and Its Molecular Orbital Study on Antioxidant Activity
รางวัลที่ได้รับ	-