ผลของสภาวะต่าง ๆ ของการอบแห้งและการสกัดต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลปอกะบิด

Effects of Drying Methods and Extraction Conditions on Total Phenolic and Flavonoid content and Antioxidant Activities of *Helicteres isora* L. Fruit Extracts

ชมพูนุช อุทัยรัตน์[1*] เอกรัฐ ศรีสุข[1]และ กล่าวขวัญ ศรีสุข[2]

Chompunut Uthairat[1*], Ekaruth Srisook[1] and Klaokwan Srisook[2]

[1]*ภาควิชาเคมี ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2]*ภาควิชาชีวเคมี ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1]*Chemistry Department, Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University*

[2]*Biochemistry Department, Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University*

Received : 1 August 2016

Accepted : 3 January 2017

Published online : 31 January 2017

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษา ผลของสภาวะต่าง ๆ ของการอบแห้งและการสกัดต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลปอกะบิด โดยนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี คือ ทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ และทดสอบความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่า สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดในทุกตัวทำละลาย ยกเว้น สารที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล 95% ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดจากการอบแห้งที่ 150 °C ของสารสกัดจากเอทานอล ส่วนในสารสกัดจากน้ำปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์จะแปรผันตรงกับอุณหภูมิ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ความสามารถในการรีดิวซ์และฤทธิ์ในการกำจัด DPPH จะแปรผันตรงกับอุณหภูมิในการอบแห้ง มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9785 และ 0.8115 ตามลำดับ ส่วนการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนสารสกัดโดยเอทานอล 70% มีความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนได้ดีที่สุด การคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกรวมในระดับปานกลางและมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟลาโวนอยด์ในระดับต่ำมาก

คำสำคัญ : ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม, สารประกอบฟลาโวนอยด์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ผลปอกะบิด

***Corresponding author. E-mail** :chompunut.ki@gmail.com

Abstract

This research studied effects of drying methods and extraction conditions on total phenolic and flavonoid content and antioxidant activities of *Helicteres isora* L. extracts by testing three antioxidant activities were DPPH radical scavenging activity, reducing power and metal chelating activity. The extracts from overexposuring to the sun and drying at 170 °C exhibited the highest total phenolic content of all solvent extracts, excepted 95% ethanol extract. The extracts from drying at 150 °C exhibited the highest flavonoid content in ethanol extract. The flavonoid content of aqueous extracts were depended on drying temperature. To determine antioxidant activities, reducing power and DPPH radical scavenging activity increased when the drying temperature was increased. The total phenolic content also showed good influence to antioxidant activities, reducing power and DPPH radical scavenging activity as evidenced by the correlation coefficient value of 0.9785 and 0.8115. All 70% ethanol extracts showed the highest metal chelating activity. The metal chelating activity also showed moderate correlation to the total phenolic content but very low correlations to total flavonoid content.

Keywords : total phenolic content, flavonoid content, antioxidant, *Helicteresisora* L.

บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์ได้เผชิญกับมลภาวะมากมายที่นับวันจะยิ่งทวีความรุนแรงมากขึ้นทุกวัน ซึ่งมลภาวะที่เพิ่มขึ้นเหล่านี้ล้วนเกิดมาจากการกระทำของมนุษย์เองทั้งสิ้น ทั้งปัญหามลพิษทางน้ำ, ปัญหามลพิษทางดิน, ปัญหามลพิษทางอากาศ,ปัญหามลพิษทางอาหาร และปัญหาของการเกิดภาวะโลกร้อน ซึ่งมลภาวะเหล่านี้เป็นตัวที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกายมากขึ้นเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ มากมาย เราจึงควรหลีกเลี่ยงการที่จะรับสารอนุมูลอิสระเข้าไปในร่างกาย แต่ปัญหา คือ ในปัจจุบันร่างกายเรารับสารพิษเกินมากไป ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายผลิตขึ้นได้เองไม่เพียงพอ หากหลีกเลี่ยงได้ยาก จึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเข้าไปช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระ เพื่อให้ร่างกายเกิดความสมดุลปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด แต่คนส่วนใหญ่ดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น จึงมีความกังวลเรื่องของสารพิษและสารตกค้างที่ได้รับจากยาและอาหารเสริมที่มีขายอยู่มากมายในปัจจุบัน และจากการศึกษา ภูมิปัญญาท้องถิ่นซึ่งมีการใช้สมุนไพรมาเป็นเวลานาน ทำให้เล็งเห็นแล้วว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากสมุนไพรมีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงน้อย จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากการสอบถามจากชาวบ้าน คนเฒ่าคนแก่ พบว่า ขณะนี้มีสมุนไพรชนิดหนึ่งได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก คือ ปอกะบิด ซึ่งนิยมนำผลปอกะบิดที่ตากแห้งแล้วที่มีขายตามท้องตลาดมาต้มกินน้ำทานเหมือนชาและมีขายเป็นผลปอกะบิดอบแห้งบดและบรรจุแคปซูลอีกด้วยเนื่องจากมีสรรพคุณกล่าวอ้างมากมาย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรจากผลปอกะบิดซึ่งมีความสัมพันธ์กับการรักษาโรคเบาหวาน แก้ปวดเคล็ดบวม รักษาแผลในกระเพาะอาหาร โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น

ปอกะบิด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helicteresisora* L. อยู่ในวงศ์ Sterculiaceae มีชื่อท้องถิ่นว่า ปอทับ มะปิด มะบิดชื่อสามัญ คือ East Indian screw tree จากการศึกษาพบว่า มีการนำเปลือกและรากของปอกะบิดมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านของอินเดียมานาน เพื่อรักษาโรคเบาหวาน (Prajapathi, Purohit, Sharmi, & Kumar, 2003) แล้วยังพบผลการวิจัยเกี่ยวกับการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของปอกะบิด มีทั้งส่วนสดและส่วนแห้งของใบ, เปลือกต้น, ผล และราก (Jain, Sinha, & Desai, 2014) โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน คือ น้ำกลั่น เอทานอล, เมทานอล, อะซิโตน, (Jain *et al*., 2012) น้ำ-เมทานอล, (Manke*et al*., 2015) เฮกเซนและไอโซโพรพานอล (Bhat, Elanchezhiyan, & Sethupathy, 2012) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิในการสกัด, ความเข้มข้นของสารละลายในการสกัด และอุณหภูมิในการอบแห้งต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากผลของปอกะบิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำผลของปอกะบิดมาอบแห้งที่อุณหภูมิต่างกันและสกัดในตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน และสกัดด้วยอุณหภูมิที่ต่างกัน เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาให้มีกระบวนการอบ และสกัดด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด เพื่อทำให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ

Microplate spectrophotometer (Liopette), Rotary evaporator R-200 (Buchi, ประเทศสมาพันธรัฐสวิส), Freeze dryer DK-3450 (Scanvac, ประเทศราชอาณาจักรเดนมาร์ก)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้ กรดแกลลิก (Gallic acid, Fluka, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), กรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH, Carlo erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เควอซิทิน (Quercetin, Sigma-aldrich, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3, Carlo erba reagent, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$, Univar, ประเทศออสเตเรีย), โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4, AR Grade, BDH chemical, ประเทศอังกฤษ), โพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide, analytical grade, Univar, ประเทศออสเตเรีย), โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4, Riedel-de Haen AG, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เฟอร์ริคคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$, Fisher Chemical, ประเทศสหราชอาณาจักร), เฟอร์โรซีน (Ferrocene, Sigma-aldrich, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$, AR grade, Qrec, ประเทศนิวซีแลนด์), เมทานอล (CH_3OH, ACS grade, Honeywell, ประเทศเกาหลี), อะลูมิเนียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($AlCl_3.6H_2O$, Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เอทานอล (C_2H_5OH, commercial grade),DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, For R&D use only, Aldrich chemistry, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), Folin-Ciocalteu reagent (FCR, Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), Ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA.2Na, AR grede, Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

พืชตัวอย่าง

ผลปอกะบิดสด

นำผลปอกะบิดสดที่เก็บจาก บ้านสันสลี อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย ช่วงเวลาเก็บ 7.00 – 10.00 น. ในวันจันทร์ที่ 1 ธันวาคม 2557 มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °C และ 150 °C อุณหภูมิละ 2 กิโลกรัม

ผลปอกะบิดแห้ง

ตัวอย่างผลปอกะบิดแห้ง 1 กิโลกรัม จากเกษตรกรท้องถิ่นจาก บ้านสันสลี อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย ที่ตาก 7-10 แดด ก่อนส่งอบโรงงานที่อุณหภูมิ 170 °C เป็นเวลา 40 นาที

1. การสกัดสารจากผลของปอกะบิด

นำผลปอกะบิดที่ได้จากการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °C และ 150 °C และผลปอกะบิดตากแห้งจากเกษตรกรท้องถิ่นมาอย่างละ 1 กิโลกรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่น แล้วเก็บในโหลพลาสติกปิดสนิท จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที แช่ในเอทานอล 40%, 70%, และ 95% เป็นเวลา 9 วันในอัตราส่วน 1: 10 โดยใช้ตัวอย่างแห้ง 20 กรัม: ตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรแล้วกรองแบบลดความดันด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 °C จากนั้นนำไปทำการ Freeze dry เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบของผลปอกะบิด

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Srisook *et al.*, 2010)

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เปรียบเทียบกับกรดแกลลิก (Gallic acid) โดยเตรียมสารละลายกรดแกลลิกในเมทานอล (Methanol) แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้ 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เริ่มจากการเติมสารละลายกรดแกลลิก หรือส่วนสกัดในเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteuปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 7 % โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นปิเปตสารผสม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมไมโครเพลท นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูล (Gallic acid equivalent) ต่อกรัมของส่วนสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ (Wattanakul *et al.*, 2009)

หาปริมาณฟลาโวนอยด์ เปรียบเทียบกับเควอซิทิน (Quercetin) โดยเตรียมสารละลายเควอซิทินในเมทานอล แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เริ่มจากการนำสารละลายเควอซิทิน หรือส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอล1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) เข้มข้น 5% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้น 10% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 2.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารผสม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมไมโครเพลทนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์จากสมการของกราฟมาตรฐานของเควอซิทิน แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลเควอซิทิน (Quercatin equivalent) ต่อกรัมของส่วนสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลปอกะบิด

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH scavenging activity (Srisook *et al*., 2010)

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ในเมทานอล จากนั้นเตรียมส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเตรียมชุดควบคุม ($A_{control}$) โดยปิเปตเมทานอล 95% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนชุดควบคุม ($A_{control}$) เตรียมโดยปิเปตส่วนสกัด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในห้องมืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดแกลลิกเป็นตัวควบคุมแบบบวก คำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH} = \left[\frac{A\ control-(A_{sample}-A_{blank})}{A_{control}}\right] \times 100$$

โดย $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม ที่ประกอบด้วยเมทานอล และสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ประกอบด้วย ส่วนสกัดและสารละลาย DPPH

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วยส่วนสกัด และเมทานอล

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำวิเคราะห์ผลเป็นค่า IC_{50}เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

4.2 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) (Srisook *et al*., 2010)

ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เปรียบเทียบกับกรดแกลลิก โดยนำสารละลายกรดแกลลิก หรือส่วนสกัด ที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.6) 0.2มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) เข้มข้น 1% ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก(TCA) เข้มข้น 10 %โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการปิเปตสารละลายส่วนบน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตรและสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์($FeCl_3$) 0.1 % โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำการปิเปตสารผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมไมโครเพลท จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์จาก กราฟมาตรฐานของแกลลิก โดยสร้างจากการนำกรดแกลลิกละลายในเมทานอล แล้วนำมา เจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับส่วนสกัดแสดงค่าความสามารถใน

การรีดิวซ์ในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูล(Gallic acid equivalent) ต่อกรัมของส่วนสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกันแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4.3 การทดสอบความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) (Srisook *et al*., 2010)

มี EDTA เป็นตัวควบคุมแบบบวก โดยเตรียมสารละลาย EDTA ในน้ำนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เริ่มจากการเติมสารละลายเฟอรัสคลอไรด์($FeCl_2$) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารละลาย EDTA หรือส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้นข้นต่าง ๆ ดังนี้ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายเฟอร์โรซีน (Ferrozine) เข้มข้น 5มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน (Percentage of Fe^{2+} ion chelating ability) จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคีเลตโลหะเฟอร์รัสไอออน} = \left[\frac{A_{control} - (A_{sample} - A_{blank})}{A_{control}}\right] \times 100$$

โดย $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วยน้ำกลั่นหรือเมทานอล เฟอร์รัสคลอไรด์ และเฟอร์โรซีน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วย สารละลาย EDTA หรือส่วนสกัด เฟอร์รัสคลอไรด์ และเฟอร์โรซีน

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วย สารละลาย EDTA หรือส่วนสกัด เฟอร์รัสคลอไรด์ และน้ำกลั่น

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลเป็นค่า IC_{50}เทียบกับกราฟมาตรฐาน DPPH

5. การวิเคราะห์ผล

แสดงข้อมูลที่ได้ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และการทดลองแต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาทดสอบความแปรปรวนโดยใช้ one-way ANOVA ($P<0.05$)

แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้การหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. น้ำหนักของสารสกัดจากผลปอกะบิด

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำจะมีร้อยละของน้ำหนักแห้งมากกว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลโดยสารสกัดที่ได้จากการต้มน้ำในหม้อนึ่งความดันที่ 121 °C จะได้ร้อยละของน้ำหนักแห้งมากกว่า สกัดโดยวิธีการต้มน้ำที่ 100 °C ส่วนสารที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละของน้ำหนักแห้งจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้ในการสกัด

เปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกันพบว่า ส่วนสกัดที่มีร้อยละน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C สกัดในเอทานอล 40% และสกัดด้วยน้ำในหม้อนึ่งความดันที่ 121 °C มีน้ำหนักเท่ากับ 2.4839 และ 2.4793 กรัม คิดเป็นร้อยละ 12.4195 และ 12.3965 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักของสารสกัดจากผลปอกะบิด

วิธีการสกัด	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)			ร้อยละของน้ำหนักแห้ง		
	อบที่ 80 °C	อบที่ 150 °C	ตากแล้วอบที่ อุณหภูมิ 170 °C	อบที่ 80 °C	อบที่ 150 °C	ตากแล้วอบที่ อุณหภูมิ 170 °C
ต้มน้ำที่ 100 °C	2.0599	2.0562	2.0902	10.2995	10.2810	10.4510
เอทานอล 40%	2.0303	1.5200	2.4839	10.1515	7.6000	12.4195
เอทานอล 70%	1.4992	1.1684	1.4201	7.4960	5.8420	7.1005
เอทานอล 95%	0.5296	0.2493	0.5601	2.6480	1.2465	2.8005
ต้มน้ำในหม้อนึ่งความดันที่ 121 °C	2.2243	2.3905	2.4793	11.1215	11.9525	12.3965

2.การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกจากสมการ $y = 2.5522x + 0.0664$, $R^2 = 0.9994$เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยเอทานอล 40% และเอทานอล 70% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khambai*et al*. (2015) ที่แสดงปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดปอกะบิดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ อะซีโตน เอทานอล95% และน้ำ พบว่า สารสกัดที่ได้จากน้ำจะมีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิด โดยวิธีการสกัดต่างกันพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม จะแปรผันตรงกับอุณหภูมิในการอบ ดังนี้ สารสกัดจากปอกะบิดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C> อบแห้งที่ 150 °C > อบแห้งที่ 80 °C ยกเว้น ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการอบแห้ง 150 °C และการตาก 7-10 แดด แล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °Cของสารสกัดที่ได้จากเอทานอล95% จะมีสารประกอบฟีนอลิกรวมลดลง ส่วนสารสกัดที่สกัดโดยเอทานอล40% คงที่ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jeong *et al*., 2004 พบว่า ในสารสกัดที่ใช้เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลายเมื่อให้ความร้อนเพิ่มขึ้นจาก 50 °C เป็น 150 °C ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากให้ความร้อน เนื่องจากความร้อนไปทำลายผนังเซลล์ของพืช (Lou *et al*., 2014)

สารสกัดที่มีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือ สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C จากนั้นนำไปสกัดโดยเอทานอล 70% ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 233.70 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากผลปอกะบิด

วิธีการสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม)		
	อบแห้งที่ 80 °C	อบแห้งที่ 150 °C	ตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C
ต้มน้ำที่ 100 °C	113.05 ± 0.82^{c,C}	177.02 ± 3.61^{c,B}	191.23 ± 3.09^{b,A}
เอทานอล 40%	123.42 ± 0.64^{a,B}	199.36 ± 2.29^{a,A}	199.55 ± 5.00^{b,A}
เอทานอล 70%	112.93 ± 1.42^{c,C}	187.79 ± 0.74^{b,B}	233.70 ± 1.32^{a,A}
เอทานอล 95%	29.77 ± 1.35^{d,C}	62.99 ± 0.36^{d,A}	53.07 ± 0.86^{c,B}
ต้มน้ำในหม้อนึ่ง ความดันที่ 121 °C	117.53 ± 1.03^{b,C}	173.31 ± 5.03^{c,B}	193.16 ± 2.60^{b,A}

หมายเหตุ $^{a-d}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

$^{A-C}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์

คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ได้จากกราฟมาตรฐานเควอซิทินจากสมการ $y = 0.2199x + 0.0386$, $R^2 = 0.9987$ เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่ 150 °C จะมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่า สารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่ 80°C เนื่องจากสารในกลุ่มฟลาวาโนนไกลโคไซด์อาจถูกทำลาย เมื่อให้ความร้อนมากกว่า 150°C เป็นเวลา 30 นาที (Xu *et al*., 2007) จึงทำให้มีสารที่เป็นฟลาโวนอยด์มากขึ้น

สารที่นำมาสกัดโดยใช้เอทานอล 40%, 70%, 95% ที่ได้จากการอบแห้งที่อุณหภูมิ 150 °C ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 302.86, 217.12 และ 259.36 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ในสารสกัดจากผลของปอกะบิดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C ที่สกัดโดยใช้เอทานอล 40%, 70%, 95% จะมีปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลงจาก 302.86, 217.12 และ 259.36 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัม เป็น 207.11, 200.75 และ 92.52 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 3 เนื่องจากการให้ความร้อนสูงอาจมีผลกระทบทำให้ฟลาโวนอยด์บางชนิดโดยทำลายได้ (Lou*et al*., 2014) ส่วนสารสกัดที่ได้จากการต้มน้ำ ที่ 100 °C มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่สารสกัดที่ได้จากการสกัดจากน้ำโดยต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C จะมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับสารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่ 150 °C

ซึ่งสารสกัดจากผลปอกะบิดที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ สารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่ 150 °C แล้วนำไปสกัดโดยเอทานอล 40% ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 302.86 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัม และสารสกัดจากผลปอกะบิดที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยที่สุดมี 2 ค่า คือ สารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่ 80 °C

แล้วนำไปสกัดโดยเอทานอล 95% และเอทานอล 40% ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 80.64 และ 80.79 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัมตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากผลปอกะบิด

วิธีการสกัด	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัม)		
	อบแห้งที่ 80 °C	อบแห้งที่ 150 °C	ตากแล้วอบที่อุณหภูมิ170 °C
ต้มน้ำที่ 100 °C	168.16 ± 3.64^{b,C}	222.32 ± 4.35^{b,B}	238.34 ± 8.12^{b,A}
เอทานอล 40%	80.79 ± 1.60^{d,C}	302.86 ± 4.88^{a,A}	207.11 ± 22.96^{b,B}
เอทานอล 70%	104.29 ± 4.34^{c,C}	217.12 ± 6.63^{b,A}	200.75 ± 1.16^{b,B}
เอทานอล 95%	80.64 ± 2.04^{d,C}	259.36 ± 27.49^{b,A}	92.52 ± 1.01^{c,B}
ต้มน้ำในหม้อนึ่งความดันที่ 121 °C	197.21 ± 7.06^{a,B}	269.92 ± 18.97^{b,A}	268.40 ± 8.88^{a,A}

หมายเหตุ $^{a-d}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

$^{A-C}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

4. การวิเคราะห์หาค่าการต้านอนุมูลอิสระ

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดที่ได้จากน้ำ จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากเอทานอล และสารสกัดจากผลปอกะบิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำที่สุด คือ สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล 95% ที่มีการอบแห้งต่างกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1,568.61, 343.53 และ 343.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shori (2013); Jain *et al.* (2014), Kumar *et al.* (2013) และKhambai*et al.* (2015) ซึ่งพบว่า ในสารสกัดของผลสดจากแอลกอฮอล์ และ น้ำ-แอลกอฮอล์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีกว่าน้ำ

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่า สารสกัดที่ได้จากการตาก 7-10 แดดแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C โดยวิธีการสกัดต่างกัน มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50}เท่ากับ 60.85, 57.75, 59.33 และ 63.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 4 รองลงมา คือ สารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่อุณหภูมิ 150 °C และ 80 °C ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Narita and Inouye (2012) ที่พบว่า เมื่อให้อุณหภูมิในการสกัดมากกว่า 100 °C เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 270 °C แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH พบว่า ค่าการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ซึ่งค่า IC_{50} ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการกำจัด DPPH ที่ดีที่สุด คือ สารสกัดที่ได้จากการตาก 7-10 แดดแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C แล้วนำไปสกัดโดยเอทานอล 40% และเอทานอล 70% ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.75 และ 59.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งในวิธีการอบแห้งนี้การสกัดโดยเอทานอลมีผลในการกำจัด DPPH ไม่ต่างจากสารสกัดจากน้ำ ยกเว้น การสกัดโดยเอทานอล 95% ซึ่งมีค่า IC_{50} ในการกำจัด DPPH ได้น้อยที่สุด

อย่างไรก็ตามสารสกัดทุกชนิดของผลปอกะบิดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ที่ต่ำกว่ากรดแกลลิก ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า IC_{50}ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการกำจัด DPPH

วิธีการสกัด	ค่า IC_{50}ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการกำจัด DPPH (µg/ml)		
	อบแห้งที่ 80 °C	อบแห้งที่ 150 °C	ตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C
ต้มน้ำที่ 100 °C	121.25 ± 0.69^{a,C}	75.90 ± 0.73^{b,B}	60.85 ± 1.15^{a,A}
เอทานอล 40%	127.95 ± 1.39^{b,C}	72.62 ± 2.39^{b,B}	57.75 ± 1.23^{a,A}
เอทานอล 70%	197.25 ± 9.01^{c,C}	83.71 ± 0.65^{c,B}	59.33 ± 2.65^{a,A}
เอทานอล 95%	1,568.61 ± 10.27^{d,B}	343.53 ± 8.87^{d,A}	343.78 ± 3.00^{b,A}
ต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C	126.90 ± 2.75^{b,C}	65.87 ± 0.10^{a,B}	63.15 ± 1.04^{a,A}

หมายเหตุ $^{a-d}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

$^{A-C}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

4.2 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power)

คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกจากสมการ $y = 10.124x + 0.0702$, $R^2 = 0.9992$ เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยการต้มน้ำที่ 100 °C สกัดโดยเอทานอล 40%, 70% และต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงเท่าๆกัน ส่วนสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยเอทานอล 95% มีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ต่ำที่สุด โดยมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ เท่ากับ 5.37, 11.82, 11.14 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัมตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar *et al*. (2013) ที่พบว่า สารสกัดจากผลปอกะบิดที่สกัดด้วย น้ำ-เมทานอล มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jain *et al*. (2014) และ Khambai*et al*. (2015) ที่พบว่า สารสกัดที่ได้จากน้ำ จะมีความสามารถในการรีดิวซ์ดีที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่า สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C ที่มีวิธีการสกัดโดยการต้มน้ำ ที่ 100 °C สกัดโดยเอทานอล40%, 70% และต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด ยกเว้นความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดโดยเอทานอล 95% ที่มีค่าใกล้เคียงกันระหว่าง การอบแห้งที่ 150 °C และจากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C โดยมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ เท่ากับ 11.82, 11.14 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัมตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ซึ่งค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากผลปอกะบิดที่ดีที่สุด คือ สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C แล้วนำไปสกัดโดยเอทานอล 40% และเอทานอล 70% ซึ่งมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ เท่ากับ 51.01 และ 55.53 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากผลปอกะบิด

วิธีการสกัด	ความสามารถในการรีดิวซ์ (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม)		
	อบแห้งที่ 80 °C	อบแห้งที่ 150 °C	ตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C
ต้มน้ำที่ 100 °C	27.63 ± 1.54^{a,B}	44.17 ± 3.10^{a,A}	47.93 ± 2.07^{a,A}
เอทานอล 40%	27.16 ± 1.38^{a,C}	42.22 ± 0.66^{a,B}	51.01 ± 1.26^{a,A}
เอทานอล 70%	27.48 ± 1.05^{a,C}	48.65 ± 1.85^{a,B}	55.53 ± 3.64^{a,A}
เอทานอล 95%	5.37 ± 0.39^{b,B}	11.82 ± 1.98^{b,A}	11.14 ± 0.25^{b,A}
ต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C	28.11 ± 0.29^{a,C}	43.95 ± 1.63^{a,B}	48.43 ± 1.26^{a,A}

หมายเหตุ ^{a,b}ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

$^{A-C}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

4.3 การทดสอบความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+})

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่าสารสกัดที่สกัดโดยเอทานอล 70% มีความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50}ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน เท่ากับ 310.03, 681.14 และ 607.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 6 รองลงมา คือ เอทานอล 40% >สารสกัดที่ได้จากการต้มในน้ำที่ 100 °C>สารสกัดที่ได้จากการต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C>สารที่สกัดโดยเอทานอล 95% ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่ 80 °C มีค่า IC_{50}ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนที่ดี เมื่อสกัดโดยเอทานอล 70% และเอทานอล 40% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 310.03 และ 450.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 6 สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C มีค่า IC_{50} ที่ดี เมื่อสกัดด้วยการต้มน้ำ ที่ 100 °C และสกัดโดยเอทานอล 95% โดยที่สารสกัดที่ได้จากการต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C ที่ได้จากการอบแห้งทั้ง 3 แบบมีค่าใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 6 ค่า IC_{50}ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน

วิธีการสกัด	ค่า IC_{50}ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	อบแห้งที่ 80 °C	อบแห้งที่ 150 °C	ตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C
ต้มน้ำที่ 100°C	961.54 ± 5.22^{c,B}	1,195.34 ± 31.79^{c,C}	891.91 ± 16.23^{c,A}
เอทานอล 40%	450.77 ± 5.18^{b,A}	729.73 ± 13.29^{b,C}	649.89 ± 22.00^{b,B}
เอทานอล 70%	310.03 ± 2.57^{a,A}	681.14 ± 7.51^{a,C}	607.97 ± 9.12^{a,B}
เอทานอล 95%	2,432.12 ± 165.23^{e,B}	2,529.86 ± 102.21^{d,B}	1,657.92 ± 243.02^{e,A}
ต้มน้ำในหม้อนึ่งความดันที่121°C	1,390.43 ± 11.35^{d,A}	1,242.90 ± 37.29^{c,A}	1,295.89 ± 99.45^{d,A}

หมายเหตุ $^{a-e}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

$^{A-C}$ประมาณค่า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n=3) ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

5.การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกร่วมต่อความสามารถในการรีดิวซ์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นความสัมพันธ์เชิงบวกที่มีความสัมพันธ์กันสูงมาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.989 และ 0.901 ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramful *et al*., (2011) ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกต่อความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนและความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อความสามารถในการรีดิวซ์ เป็นความสัมพันธ์เชิงบวกที่มีความสัมพันธ์กันปานกลาง ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramful *et al*. (2011) ที่พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อความสามารถในการรีดิวซ์ ไม่มีความสัมพันธ์กัน ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ และปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมากโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.008 ผลดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ความสามารถในการรีดิวซ์และความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R)	ปริมาณฟีนอลิกรวม	ปริมาณฟลาโวนอยด์
ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิระ DPPH	0.901	0.409
ความสามารถในการรีดิวซ์	0.989	0.601
ความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน	0.672	0.008

สรุปผลการวิจัย

1. จากการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากผลของปอกะบิดเมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกันพบว่า ส่วนใหญ่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะแปรผันตรงกับอุณหภูมิในการอบ โดยที่ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากผลปอกะบิดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C > อบแห้งที่ 150 °C > อบแห้งที่ 80 °C

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยเอทานอล 40%และเอทานอล 70% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด

2. จากการศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่าในสารสกัดจากเอทานอล 40%, 70%, 95% จะมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์เรียงตามลำดับ โดยที่ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากผลปอกะบิดที่ได้จากการอบแห้งที่ 150°C > สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C > อบแห้งที่ 80 °C ในสารสกัดจากน้ำ ส่วนใหญ่ปริมาณฟลาโวนอยด์จะแปรผันตรงกับอุณหภูมิในการอบ โดยที่ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากผลปอกะบิดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C > อบแห้งที่ 150 °C > อบแห้งที่ 80°C

3. วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่าส่วนใหญ่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะแปรผันตรงกับอุณหภูมิในการอบ โดยที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากผลปอกะบิดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C > อบแห้งที่ 150 °C > อบแห้งที่ 80°C

เมื่อหาความสัมพันธ์พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฟีนอลิกรวมในระดับสูงมาก และมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟลาโวนอยด์ในระดับต่ำ

4. วิธีการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่า ส่วนใหญ่ความสามารถในการรีดิวซ์ จะแปรผันตรงกับอุณหภูมิในการอบ โดยที่ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากผลปอกะบิดที่ได้จากการตาก แล้วอบที่ 170 °C > อบแห้งที่ 150 °C > อบแห้งที่ 80 °C

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยการต้มน้ำที่ 100 °C สกัดโดยเอทานอล 40%, 70% และต้มน้ำในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงเท่า ๆ กัน ส่วนสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยเอทานอล 95% มีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ต่ำที่สุด

เมื่อหาความสัมพันธ์พบว่า ความสามารถในการรีดิวซ์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฟีนอลิกรวมในระดับสูงมาก และมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟลาโวนอยด์ในระดับปานกลาง

5. วิธีการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการอบแห้งผลของปอกะบิดโดยวิธีการสกัดต่างกัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการอบแห้งที่ 80 °C มีค่า IC_{50} ของสารสกัดจากผลปอกะบิดในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนที่ดี เมื่อสกัดโดยเอทานอล 70% และเอทานอล 40% สารสกัดที่ได้จากการตากแล้วอบที่อุณหภูมิ 170 °C มีค่า IC_{50} ที่ดี เมื่อสกัดด้วยการต้มน้ำที่ 100 °C และสกัดโดยเอทานอล 95%

เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดที่ได้จากสารสกัดผลปอกะบิดที่มีการอบแห้งต่างกัน พบว่าสารสกัดที่สกัดโดยเอทานอล 70% มีความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนได้ดีที่สุดรองลงมา คือ เอทานอล 40% > สารสกัดที่

ได้จากการต้มในน้ำที่ 100 °C > สารสกัดที่ได้จากการต้มน้ำในหม้อนึ่งความดันที่ 121 °C > สารที่สกัดโดยเอทานอล 95% ตามลำดับ

เมื่อหาความสัมพันธ์พบว่าความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออนมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวมในระดับปานกลาง และมีความสัมพันธ์ต่ำมากกับปริมาณฟลาโวนอยด์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา ขอขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) และภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Bhat, B. A., Elanchezhiyan, C., &Sethupathy, S. (2012). In vitro antioxidative role of *HelicteresIsora* (L). *International Journal of Bioassays*, *1*(12), 171-183.

Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., Kafri, R., Kirschner, M. W., Clish, C. B., &Mootha, V. K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science Translational Medicine*, *336*(6084), 1040-1044.

Jain, A., Sinha, P., & Desai, N. S. (2014). Estimation of flavonoid, phenol content and antioxidant potential of Indian screw tree (*Helicteresisora* L.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *5*(4),1320-1330.

Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S. C. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3389-3393.

Khambai, M., Hasee, P., Chaiphosri, C., Liangraksa, V., Tinrat, S., &Singhapol, C. (2015). Antioxidant analysis of *Garcinia cowa* and East Indian screw tree extracted by different solvents. In *Thailand-Japan Student Science Fair 2015.* Bangkok: King Mongkut's University of Technology North Bangkok.

Kumar, V., Sharma, M., Lemos, M., &Shriram, V. (2013). Efficacy of *Helicteresisora* L. against free radicals, lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage. *Journal of Pharmacy Research*, *6*, 620-625.

Lou, S. N., Lin, Y. S., Hsu, Y. S., Chiu, E. M., & Ho, C. T. (2014). Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. *Food Chemistry*, *161*, 246-253.

Menke, A., Casagrande, S., Geiss, L., &Cowie, C. C. (2015). Prevalence of and trends in diabetes among adults in the United States, 1988-2012. *The Journal of the American Medical Association*, *314*(10), 1021-1029.

Narita, Y., & Inouye, K. (2012). High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chemistry, 135,* 943–949.

Prajapathi, N. D., Purohit, S. S., Sharmi, A. K., & Kumar, T. (2003). *A Handbook of Medicinal Plants: A Complete Source Book*. Jodhpur India: Shyam Printing Press.

Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E., &Bahorun, T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, *44*, 2088–2099.

Shori, A. (2013). An emerging medicinal plant with promising in vitro antioxidant potential *Helicteresisora* Linn. In *International Conference and Exhibition onPharmacognosyPhytochemistry& Natural Products*. Hyderabad India: Omics Group.

Srisook, K., Salee, P., Charoensuk, Y., &Srisook, E. (2010). In vitro anti-oxidant and anti-tyrosinase activities of the rhizomal extracts from *Amomum biflorum* Jack. *Thai Journal of Botany, 2* (Special Issue), 143-150. (in Thai)

Wattanakul, U., Wattanakul, W., Lerssuthichawal, T., &Puengyam, P. (2009).Determination of antioxidant activity,total phenolic compounds and flavonoid contents of mangrove plants extracts from Rajamangala beach, Trang province. *TSU Conference 19.* Songkla: Thaksin University.(in Thai)

Xu, G. H., Ye, X. G., Chen, J. C., & Liu, D. H. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 330–335.