

ST-02

การพัฒนาการวัดสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งไทยด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีขนาดเล็ก Development of small-scale TLC based analysis of antioxidant properties of Thai honey

ภัทรพร ขอบประดิล¹ ชฎิล กุลสิงห์² และธรรมนุญ หนูจักร³

Pattaporn Chobpradit¹, Chadin Kulsing², and Thumnoon Nhujak³

^{1,2,3}ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: p.chobpradit@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH• assay) บนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography; TLC) ขนาดเล็ก (TLC-DPPH•) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งไทยต่างชนิดกัน วิธีการนี้จะใช้ DPPH• assay ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยทำการวิเคราะห์บนแผ่น TLC ก่อนการวิเคราะห์ต้องเตรียมสารตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเฟสของเหลวโดยใช้ dichloromethane การวิเคราะห์แต่ละครั้งต้องผสมตัวอย่าง 16 μ L กับ DPPH• reagent 24 μ L จากนั้น ใช้โปรแกรม ImageJ วิเคราะห์ค่าสี สำหรับหาปริมาณ DPPH• เหลือบนแต่ละจุด (spot) ของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งจะสามารถแปลงเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ซึ่งจะนำไปสู่การคำนวณความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (50% Inhibitory concentration; IC₅₀) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง วิธีนี้ถูกตรวจสอบความถูกต้องโดยการเปรียบเทียบผลของ %inhibition ของ L-ascorbic acid (LA) และ น้ำผึ้งดอกกล้วย (LON1) สกัด ที่ได้จากวิธี TLC-DPPH• กับ เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) ตรวจจับด้วย UV detector แบบไม่ใช้คอลัมน์แยก ซึ่งให้ผลที่สัมพันธ์กันที่ R² 0.98 และ 0.95 ตามลำดับ วิธี TLC-DPPH• ถูกนำไปประยุกต์ใช้จริงกับตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 7 ตัวอย่างที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่ โดยให้ค่า IC₅₀ ระหว่าง 9130 \pm 1 ถึง 24205 \pm 2 mg/L วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้คาดหวังว่าจะมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในอาหารอย่างง่าย รวดเร็ว (11 second/spot) และคุ้มค่าในอนาคตต่อไป

คำหลัก: สารต้านอนุมูลอิสระ น้ำผึ้ง ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

Abstract

This study developed small-scale method for analysis of antioxidant activity of different honey samples, the method is based on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay on thin-layer chromatography plate (TLC-DPPH•). Prior to analysis, the samples were prepared by liquid-liquid extraction (LLE) using dichloromethane. Each analysis requires 16 μ L of sample and 24 μ L DPPH• reagent mixture. ImageJ was applied to quantify the



remaining DPPH• on the spots of samples at different concentrations, which can then be converted into %inhibition. IC₅₀ was then calculated for each sample from the %inhibition vs sample concentration plot. Under the optimized condition, average analysis time for each spot was 11 sec. The method was validated by comparison with micro UV visible analysis using high- performance liquid chromatography (HPLC) system. This reveals the correlations with R² of 0.98 and 0.95 for L-ascorbic acid and the selected honey sample, respectively. The method was then applied to analyze 7 honey samples collected from different sources in Chiangmai, Thailand. Their IC₅₀ values were between 9130±1 and 24205±2 mg/L. The developed method is expected to be useful for rapid, simple and cost-effective analysis of antioxidants of food samples in the future.

Keywords: antioxidant, honey, thin-layer chromatography

บทนำ

น้ำผึ้งเป็นแหล่งพลังงานจากธรรมชาติที่อุดมไปด้วยสารประกอบทางเคมีและชีวเคมีที่มีประโยชน์ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ถูกถ่ายโอนจากส่วนต่าง ๆ ของพืชสู่น้ำผึ้ง (White, 1996, Jennifer, 2013) องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งด้วยน้ำตาลและน้ำ นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์ เอนไซม์ กรดอะมิโน โปรตีน แร่ธาตุ ธาตุ สารประกอบโอรมา และสารประกอบฟีนอลอีกปริมาณหนึ่ง โดยสารประกอบฟีนอลในน้ำผึ้ง ประกอบไปด้วย volatile phenols, phenolic acids และ polyphenols ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ phenolic acids และ flavonoids สารประกอบเหล่านี้มักถูกใช้สำหรับการศึกษาด้านชีวภาพ เคมี เกษตร และการแพทย์ (Erejuwa, Sulaiman, & Ab Wahab, 2012; Santos-Buelga, 2017) สารประกอบฟีนอลนอกจากถูกใช้เป็นเครื่องหมายเคมีอนุกรมวิธาน (Chemotaxonomic markers) ของพืชชนิดต่าง ๆ แล้ว ยังมีประโยชน์ทางเภสัชวิทยา เช่น ด้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน ต้านเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันการเกิดมะเร็ง ป้องกัน/บรรเทาการอักเสบ การป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ป้องกันหลอดเลือดและหัวใจจากการถูกทำลายหรือการเกิดโรคต่าง ๆ และมีคุณสมบัติรักษาบาดแผล (Baruah, 2011; Pasupuleti, Sammugam, Ramesh, & Gan, 2017)

สารต้านอนุมูลอิสระคือ สารประกอบที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระนั้น ทำให้สามารถชะลอหรือยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ได้ (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010) DPPH• assay เป็นวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้วิธีหนึ่ง โดยการทำให้ปฏิกิริยาระหว่าง DPPH• และสารตัวอย่างที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองและวัดสีที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) หรือ HPLC ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะรายงานในรูปแบบความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) วิธีนี้มีข้อดีคือ รวดเร็ว และมีความแม่นยำ แต่ต้องใช้สารปริมาณมาก เครื่องมือวิเคราะห์มีราคาแพง และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-layer chromatography; TLC) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารประกอบฟีนอลในน้ำผึ้ง ซึ่งสามารถบ่งบอกลักษณะเฉพาะของต้นกำเนิดทางพฤกษศาสตร์ที่แตกต่างกันโดยการเปรียบเทียบค่า R_f (retention factors) (El-Badrawy, 2001; Locher, Neumann, & Sostaric, 2017; Stanek & Jasicka-Misiak, 2018) นอกจากนี้การทำงานร่วมกันของวิธี TLC กับวิธีการวัดสีผ่านระบบซอฟต์แวร์ (colorimetric software) ทำให้สามารถวิเคราะห์



สารต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Akar, Küçük, & Doğan, 2017; Dinakaran, Chelle, & Avasarala, 2019; Jesionek, Majer-Dziedzic, & Choma, 2015) แต่วิธีนี้ยังคงใช้ระยะเวลาและใช้สารปริมาณมาก ในการวิเคราะห์งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งไทยด้วย DPPH• assay บน แผ่น TLC (TLC-DPPH•) ขนาดเล็ก ร่วมกับ colorimetric software วิธีนี้ ใช้เวลาในการวิเคราะห์และใช้สารประมาณน้อย นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์อีกด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งไทยด้วย DPPH• assay บนแผ่น TLC (TLC-DPPH•) ขนาดเล็ก

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดน้ำผึ้งและเตรียมสารตัวอย่าง

ละลายน้ำผึ้ง 10 g ในน้ำ 10 mL จากนั้นสกัดสารที่ต้องการด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) (AR grade, Darmstadt, Germany) 25 mL 3 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำตาลที่อาจรบกวนการวิเคราะห์ จากนั้นเติม magnesium sulfate (ACS reagent grade, Panreac, Spain) เพื่อช่วยในการดูดน้ำหรือน้ำตาลที่อาจปะปนมา (Locher et al., 2017) ระเหยสารละลายด้วยเครื่องระเหยด้วย ไนโตรเจนแก๊ส สารสกัดน้ำผึ้งที่ได้จะถูกละลายด้วย 50% acetonitrile (ACN) (AR grade, J.T. Baker, USA) grade in dichloromethane (ACN/ CH_2Cl_2)

สารละลาย L-ascorbic acid (LA) (ACS reagent grade, Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 1000 mg/L และ DPPH• reagent (HPLC grade, TCL, Japan) ความเข้มข้น 788.64 mg/L สำหรับเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ถูกเตรียมโดยการละลายสารมาตรฐานและ DPPH• ใน 50% ACN/ CH_2Cl_2

เตรียมสารละลาย LA และสารสกัดน้ำผึ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ LA เข้มข้น 50-300 mg/L, LON1 และ LON2 เข้มข้น 1000-20000 mg/mL LYN1, LYN2, WIF1 และ WIF2 เข้มข้น 1000-25000 mg/mL และ COF เข้มข้น 5000-30000 mg/L



ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของตัวอย่างน้ำผึ้งจากจังหวัดเชียงใหม่ และผล IC₅₀ (n=3) and ความแม่นยำ (%RSD, n=9) ที่ได้จากวิธี TLC- DPPH•

ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา (วันผลิต)	รหัสตัวอย่าง	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	IC ₅₀ (mg/L)
น้ำผึ้งดอกกล้วย	Fora bee farm (26 กุมภาพันธ์ 2561)	LON1	856	2594	9149 (2)
น้ำผึ้งดอกกล้วย	Supha farm (15 มีนาคม 2561)	LON2	850	2576	9130 (1)
น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่	Fora bee farm (19 กุมภาพันธ์ 2561)	LYN1	1658	5023	22031 (3)
น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่	Supha farm (26 กุมภาพันธ์ 2561)	LYN2	1307	3962	18983 (3)
น้ำผึ้งดอกไม้ป่า	Fora bee farm (16 มกราคม 2561)	WIF1	1319	3996	14106 (1)
น้ำผึ้งดอกไม้ป่า	Supha farm (12 กุมภาพันธ์ 2561)	WIF2	1285	3895	12712 (2)
น้ำผึ้งดอกกาแพ	Fora bee farm (26 พฤษภาคม 2560)	COF	1735	5258	24205 (2)
	L-ascorbic acid	LA	10	29	130 (0.8)

TLC-DPPH• assay

สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ของ DPPH• reagent โดยการไหลตสารละลาย 2 μ L ลงบนแผ่น TLC ทำการไหลตสารละลายทั้งหมด 3 spot

สารละลาย LA 16 μ L ผสมกับ DPPH• reagent 24 μ L เก็บสารละลายไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5-30 minutes โหลดสารละลาย 2 μ L ลงบนแผ่น TLC โดยทำการไหลตสารละลายทั้งหมด 3 spot ถ่ายรูปผลแผ่น TLC ด้วยกล้องโทรศัพท์ (ความละเอียด 12 megapixel) หลังจากไหลตสารละลายลงบนแผ่น TLC 0-30 minutes

การวิเคราะห์ข้อมูล

รูปถ่ายผลแผ่น TLC จะถูกประมวลผลด้วยโปรแกรม ImageJ โดยจะประมวลผลด้วยการวัดค่าความเข้มสีเฉลี่ยบน spot ของแต่ละ spot 4 โหมด ได้แก่ สีแดง สีเขียว สีน้ำเงิน และสีเทา สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและค่าความเข้มของสีของ DPPH• reagent แต่ละความเข้มข้นเพื่อเปรียบเทียบความเข้มสีของ DPPH• ที่เหลือในตัวอย่าง ความเข้มสีของ DPPH• ที่



เหลือในแต่ละตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนเป็น %inhibition ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและ %inhibition ทำให้สามารถหาค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างแต่ละตัวได้

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

LA และ LON1 ถูกเลือกใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วย UV detector โดยใช้เครื่อง HPLC (Agilence 1260) แบบไม่ใช้คอลัมน์ (Edwards & Alexander, 2017) ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ (Mobile phase) คือ 50% ACN/EtOH ด้วยอัตราการไหล $0.200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ สารละลายถูกตรวจจับที่ความยาวคลื่น 517 nm

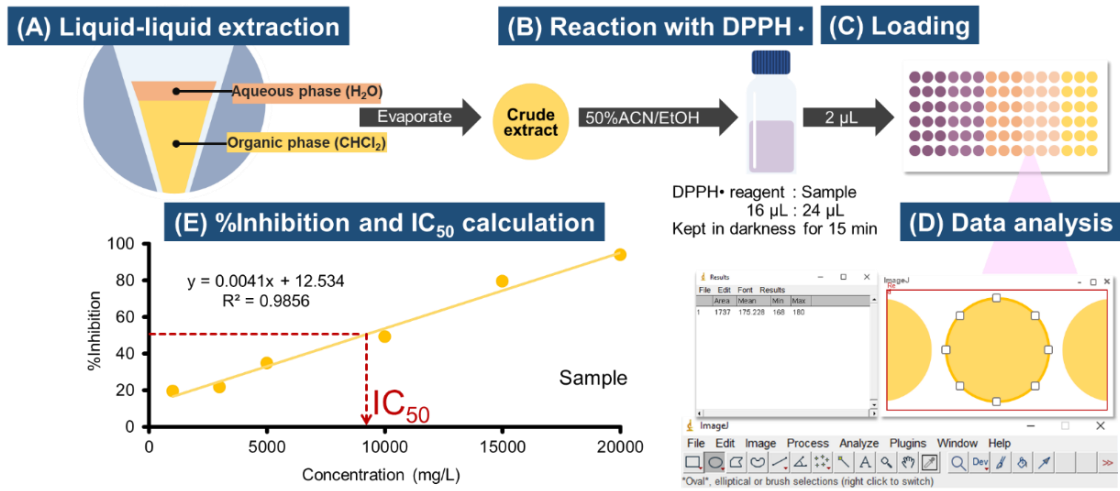
สารละลาย $160 \mu\text{L}$ ผสมกับ DPPH• reagent $240 \mu\text{L}$ กรองด้วย filter membrane เก็บสารละลายไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 minutes จากนั้นฉีดสารละลาย $2 \mu\text{L}$ เข้าสู่เครื่อง HPLC

การประยุกต์ใช้

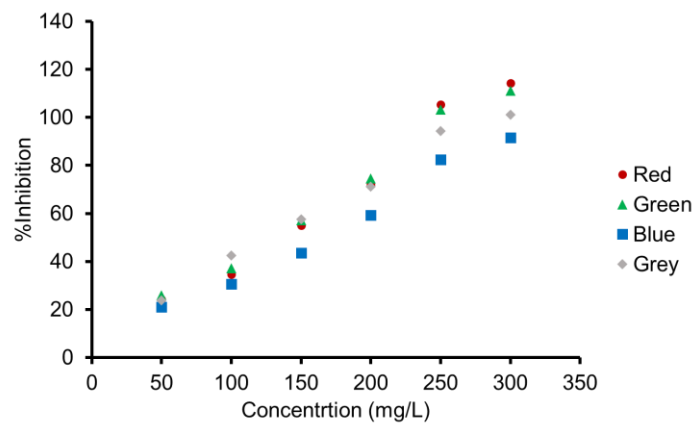
ผสมสารละลาย LA หรือสารสกัดน้ำผึ้งที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ $16 \mu\text{L}$ กับ DPPH• reagent $24 \mu\text{L}$ เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 minutes โหลดสารละลาย $2 \mu\text{L}$ ลงบนแผ่น TLC ($12 \times 7 \text{ cm}$) โดยทำการโหลดทั้งหมด 3 spot ถ่ายรูปผลแผ่น TLC ด้วยกล้องโทรศัพท์ จากนั้นแปรผลที่ได้โดยการวัดค่าความเข้มของสีแดงเพื่อใช้ในการหา IC_{50}

ผลการวิจัย

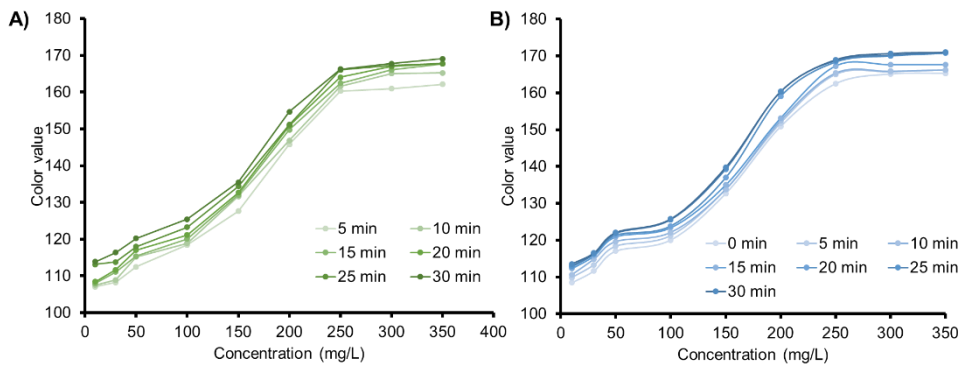
การศึกษานี้พัฒนาการวิธี TLC-DPPH• ขนาดเล็กสำหรับการวิเคราะห์สารสกัดน้ำผึ้งโดยเริ่มตั้งแต่การเตรียมสารตัวอย่างไปจนถึงการคำนวณ IC_{50} ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งวิธีการนี้ใช้ปริมาณสารตัวอย่างเพียง $16 \mu\text{L}$ ต่อการวิเคราะห์หนึ่งครั้ง ค่าความเข้มของสีแดงถูกเลือกใช้สำหรับการวิเคราะห์ DPPH• ที่เหลือในตัวอย่าง เนื่องจากให้สัญญาณที่สูงที่สุดซึ่งบ่งบอกถึงสีเหลืองที่เกิดขึ้นเมื่อ LA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำปฏิกิริยากับ DPPH• สีม่วงซึ่งทำหน้าที่เป็นอนุมูลอิสระ (รูปที่ 2) ความถูกต้องของวิธีนี้ถูกตรวจสอบด้วยความเที่ยงตรง (Precision) และเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย UV จากนั้นจึงนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้สำหรับตัวอย่างน้ำผึ้งที่มีแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน จากการศึกษาเวลาที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่าง LA และ DPPH• reagent พบว่า ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ภายใน 5 minutes (ดูข้อมูลกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีและความเข้มข้นของ LA ในรูปที่ 3A) แต่ในการศึกษานี้จะเก็บสารละลายไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 minutes เพื่อให้สารตัวอย่างอื่น ๆ ทำปฏิกิริยากับ DPPH• reagent ได้นานขึ้นและสามารถวิเคราะห์หลาย ๆ ตัวอย่างได้บนแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน โดยต้องคำนึงว่าหากเพิ่มจำนวนสารตัวอย่าง เวลาในการโหลดสารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC และเวลาที่สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH• reagent ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ตัวอย่างแต่ละตัวจะต้องเกิดปฏิกิริยากับ DPPH• reagent ด้วยระยะเวลาเท่า ๆ กันด้วย อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างสูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ในแผ่นเดียวกันจะถูกกำหนดด้วยความเสถียรของ DPPH• reagent ซึ่งสามารถสังเกตได้จากความเข้มสีที่มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ความเข้มของ DPPH• reagent) หลังจากโหลดสารละลายลงบนแผ่น TLC 15 minutes (รูปที่ 3B) โดยในการศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมด 162 ตัวอย่าง ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 15 minutes และเวลาในการโหลดสารตัวอย่างทั้งหมด 15 minutes



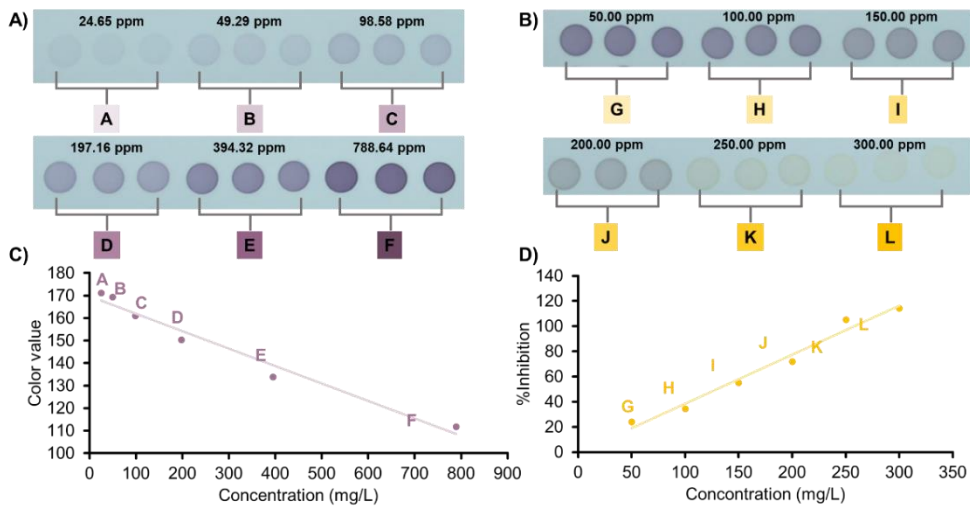
รูปที่ 1 แผนภาพแสดงภาพรวมของกระบวนการทำ TLC-DPPH•



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition และความเข้มข้นของ LA



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีและความเข้มข้นของ LA ที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH• reagent (A) และสารละลายหลังจากไหลลงบนแผ่น TLC



รูปที่ 4 ผลการทดลองของ spot ทั้ง 3 ซ้ำของ (A) DPPH• reagent และ (B) สารละลาย LA และ DPPH• reagent (788.64 mg/L) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (C) ค่าความเข้มสีกับความเข้มข้นของ DPPH• reagent และ (D) %inhibition กับความเข้มข้นของ LA

Note: ตัวอักษร a-f ใน (C) ระบุถึงค่าความเข้มสีเฉลี่ยบนพื้นที่ spot ใน (A) และ g-l ใน (D) ระบุถึงค่าความเข้มสีเฉลี่ยบนพื้นที่ spot ใน (B) และสมการเส้นตรงของกราฟ (C) และ (D) คือ $y = -0.0776x + 169.71$ ($R^2 = 0.97$) และ $y = 0.3882x - 0.376$ ($R^2 = 0.98$) ตามลำดับ

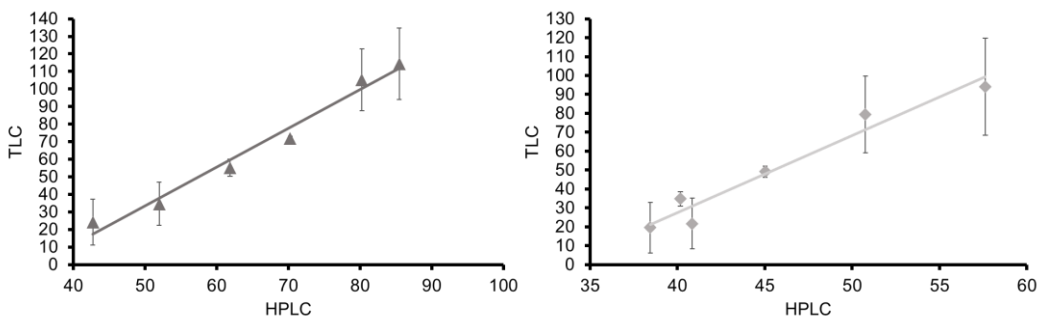
สร้างกราฟมาตรฐานของ DPPH• แสดงดังรูปที่ 4C ที่ใช้สำหรับการวัด %Inhibition ซึ่งได้มาจากการค่าความเข้มสีเฉลี่ยบน spot ทั้ง 3 spot (รูปที่ 4A) จากนั้นค่าสีนี้จะถูกใช้คำนวณความเข้มข้นของ DPPH• ที่เหลืออยู่ใน LA (รูปที่ 4B) %Inhibition

จะถูกคำนวณโดยเปรียบเทียบจากความเข้มข้น DPPH• ที่เหลือกับความเข้มข้น DPPH• ตอนแรก (รูปที่ 4D) หลังจากนั้น IC₅₀ จะสามารถคำนวณได้จากกราฟในรูปที่ 4D โดยหาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50%

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

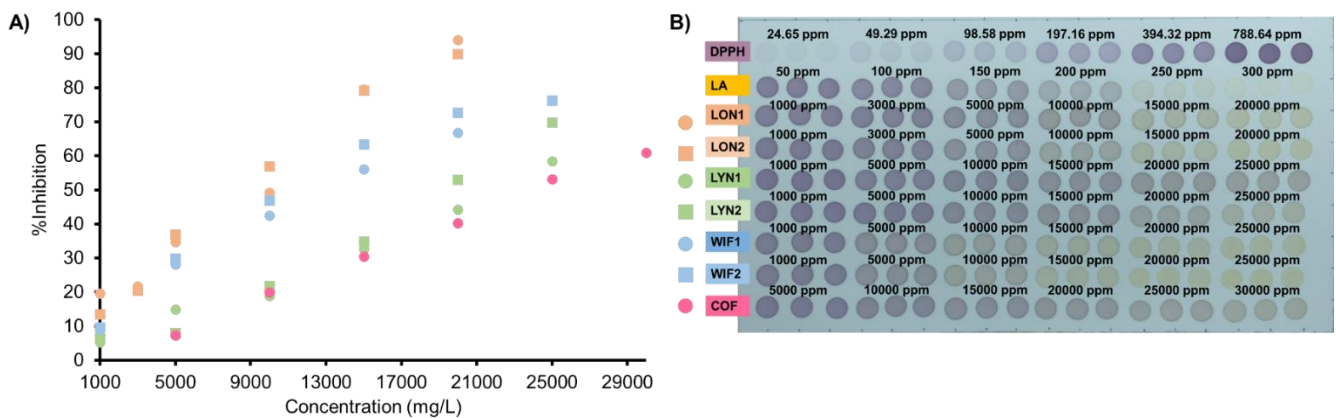
เนื่องจากปริมาณสารตัวอย่างที่มีอยู่อย่างจำกัด ผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC- DPPH• จึงถูกตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบกับกรวิเคราะห์ด้วย UV detector โดยใช้เครื่อง HPLC แบบไม่ใช้คอลัมน์แยก

ผลการวิเคราะห์ของวิธี TLC- DPPH• และ HPLC มีความสัมพันธ์กันกล่าวคือ เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ระหว่างผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC- DPPH• และ HPLC ของ LA และ LON1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ากราฟแสดงความสัมพันธ์ที่ R² 0.98 (รูปที่ 5A) และ R² 0.95 (รูปที่ 5B) ตามลำดับ



รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ระหว่างผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC- DPPH• และ HPLC ของ (A) LA และ (B) LON1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Note: สมการเส้นตรงของกราฟ (A) และ (B) คือ $y = 2.2073x - 76.864$ (R² 0.98) และ $y = 4.0683x - 135.22$ (R² 0.95) ตามลำดับ



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำผึ้ง (A) ที่ได้จากจากค่าความเข้มสีของแต่ละ spot บนแผ่น TLC (B)

Note: สมการเส้นตรงของกราฟ (LON1), (LON2), (LYN1), (LYN2), (WIF1), (WIF2) และ (COF) คือ $y = 0.0041x + 12.534$ (R² 0.98), $y = 0.0042x + 12.003$ (R² 0.98), $y = 0.0022x + 1.607$ (R² 0.98), $y = 0.0027x - 2.4301$ (R² 0.97), $y = 0.0027x + 11.955$ (R² 0.98), $y = 0.0028x + 14.449$ (R² 0.94) และ $y = 0.0022x - 2.3896$ (R² 0.99) ตามลำดับ



วิธี TLC- DPPH• ที่ได้รับการพัฒนานี้ ถูกนำไปใช้สำหรับการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผึ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งถูกนำเสนอในรูปแบบของ %inhibition ดังแสดงในกราฟรูปที่ 6A พร้อมทั้งผลการทดลองที่สอดคล้องกันดังรูปที่ 6B ซึ่งแสดงค่าความเป็นเส้นตรงที่มีค่า R^2 มากกว่า 0.94 ในทุกสารตัวอย่าง โดยผลของแต่ละตัวอย่างถูกแปลงเป็น IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด (น้ำผึ้งดอกกล้วย ดอกลิ้นจี่ ดอกไม้ป่า และดอกกาแฟ) ถูกนำมาวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิธีที่ถูกพัฒนานี้ โดยน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิดถูกผลิตขึ้นในจังหวัดเดียวกันแต่มีแหล่งผลิตที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าแหล่งกำเนิดทางพฤกษศาสตร์ (botanical origin) ของน้ำผึ้งมีผลต่อค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าแหล่งผลิตและหากเปรียบเทียบน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิดที่ผลิตในปีเดียวกันจะพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหรือ IC_{50} เป็นไปตามลำดับดังนี้ น้ำผึ้งดอกกล้วย > น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ > น้ำผึ้งดอกไม้ป่า ในขณะที่น้ำผึ้งดอกกาแฟให้ IC_{50} ต่ำที่สุดซึ่งอาจเป็นผลจากอายุในการเก็บรักษาหรือแหล่งกำเนิดทางพฤกษศาสตร์

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีการทดลองขนาดเล็ก ง่าย และราคาถูก สำหรับการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำผึ้งไทย และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาด้วยการเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี HPLC จากวิธีวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแบบใหม่นี้พบว่าสามารถไหลสารตัวอย่างได้สูงสุดถึง 162 spot บนแผ่น TLC เพียงแผ่นเดียวและใช้เวลาทั้งหมดเพียง 30 minutes สำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างทั้งหมด (11 second/spot) แนวทางที่พัฒนาขึ้นนี้ผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถนำไปปรับใช้ได้ในการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสำหรับการวิเคราะห์อาหารอื่น ๆ ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Akar, Z., Küçük, M., & Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH(•) scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 640-647. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1284068>.
- Baruah, J. B. (2011). *Chemistry of phenolic compounds: state of the art*. New York: Nova Science publishers.
- Dinakaran, S. K., Chelle, S., & Avsarala, H. (2019). Profiling and determination of phenolic compounds in poly herbal formulations and their comparative evaluation. *J Tradit Complement Med*, 9(4), 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.12.001>.
- Edwards, A. A., & Alexander, B. D. (2017). UV-Visible Absorption Spectroscopy, Organic Applications. In J. C. Lindon, G. E. Tranter & D. W. Koppenaal (Eds.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)* (pp. 511-519). Oxford: Academic Press.
- El-Badrawy, E.-F. H. a. E. E. Y. (2001). Flavonoids of Propolis and Their Antibacterial Activities. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4, 204-207. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2001.204.207>.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2012). Honey: a novel antioxidant. *Molecules*, 17(4), 4400-4423. <https://doi.org/10.3390/molecules17044400>.



- Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. M. (2015). Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC–MS, and TLC–DPPH•. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(11), 1147-1153. <https://doi.org/10.1080/10826076.2015.1028295>.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- Locher, C., Neumann, J., & Sostaric, T. (2017). Authentication of Honeys of Different Floral Origins via High-Performance Thin-Layer Chromatographic Fingerprinting. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 30(1), 57-62. <https://doi.org/10.1556/1006.2017.30.1.8>.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 1259510. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>.
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2017). *Bee products - chemical and biological properties*. New York: Springer.
- Stanek, N., & Jasicka-Misiak, I. (2018). HPTLC Phenolic Profiles as Useful Tools for the Authentication of Honey. *Food Analytical Methods*, 11(11), 2979-2989. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1281-3>.