

การสังเคราะห์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพรบฟลูออเรสเซนต์ฟลาโวนอล (3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one) Synthesis and Antioxidant Activity of a Flavonol-Based Fluorescent Probe (3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one)

จุฑามาศ ดวงกมล^{1*} ปรียาภรณ์ เพียสังกะ² อรรถยา นนทิวรรธก³ ธนากร ศิริอนันต์มณี⁴
ณัฐพัชร สหพัฒน์สมบัติ⁵ อมลรดา สาธิน⁶ และณิชา วงศ์อภิชาติ⁷
Chuthamat Duangkamol^{1*} Pariyaporn Piasangka² Attaya Nontiwantok³ Thanakorn Siriananmanee⁴
Natapat Sahaphatsombut⁵ Amolrada Sathin⁶ and Nachicha Wongapichart⁷

Received: April 10, 2024; Revised: July 4, 2024; Accepted: July 10, 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติทางแสง และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Assay ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของโพรบฟลูออเรสเซนต์ฟลาโวนอล (3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one) โดยฟลาโวนอลที่ได้นำมาทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสง ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวมด้วย Folin-Ciocalteu's Reagent โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมโดยใช้เคอวิชทินเป็นสารมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าฟลาโวนอลมีสมบัติการดูดกลืนแสงโดยกระตุ้นแสงที่ 355 นาโนเมตร และค่าการเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 418 นาโนเมตร (Ex 355 nm/Em 418 nm) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสังเคราะห์ฟลาโวนอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีเปอร์เซ็นต์การต้านออกซิเดชันของ DPPH Radicals อยู่ที่ 44.7 เปอร์เซ็นต์ที่ 10 mg/mL มีปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 1.239 ± 0.043 mgGAE/gDW และ 1.312 ± 0.014 mgCE/gDW จะเห็นว่าสารสังเคราะห์ฟลาโวนอลมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันที่ดี ซึ่งสามารถนำข้อมูลจากการวิจัยนี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และพัฒนาในทางการแพทย์ต่อไป

คำสำคัญ : ฟลาโวนอล; สารเรืองแสง; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ปริมาณฟีนอลิก; ปริมาณฟลาโวนอยด์

¹ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี

² โรงเรียนขอนแก่นวิทยายน

³ โรงเรียนนานาชาติสิงคโปร์ ธนบุรี, กรุงเทพมหานคร

⁴ โรงเรียนนานาชาติฮาร์โรว์, กรุงเทพมหานคร

⁵ โรงเรียนสาธิตนานาชาติ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

⁶ โรงเรียนระยองวิทยาคม ระยอง

⁷ อ็อกฟอด อินเทอร์เนชั่นแนล คอเลจ, สหราชอาณาจักร

* Corresponding Author, Tel. 08 0404 0816, E - mail: chuthamat.d@ptu.ac.th

¹ Faculty of Allied Health Sciences, Pathumthani University

² Khon Kaen Wittayayon School

³ Singapore International School Thonburi, Bangkok

⁴ Harrow International School, Bangkok

⁵ King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang International Demonstration School, Bangkok

⁶ Rayongwittayakom School, Rayong

⁷ Oxford International College, United Kingdom

Abstract

The purpose of this study was to investigate the absorption, emission properties, antioxidant activities, total phenolic compound, and total flavonoid contents of the flavonol-based fluorescent probe (3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one). The antioxidant activity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Total phenolic content was also determined using Folin-Ciocalteu's reagent with gallic acid as a standard, as well as total flavonoid content using quercetin as a standard substance. The results found that flavonols have absorption properties. It has the highest absorbance at 355 nm and the highest emission at 418 nm (Ex 355 nm / Em 418 nm). Furthermore, synthetic flavonols were discovered to have antioxidant properties, with DPPH radicals showing a 44.7 % anti-oxidation value at 10 mg/mL. Total phenolic content and total flavonoids were 1.239 ± 0.043 mgGAE/gDW and 1.312 ± 0.014 mgCE/gDW. Therefore, synthetic flavonols exhibit antioxidant activity. The findings of this study can be used to develop new products as well as medical research.

Keywords: Flavonols; Fluorescent Probe; Antioxidants; Phenolic Content; Flavonoid Content

บทนำ

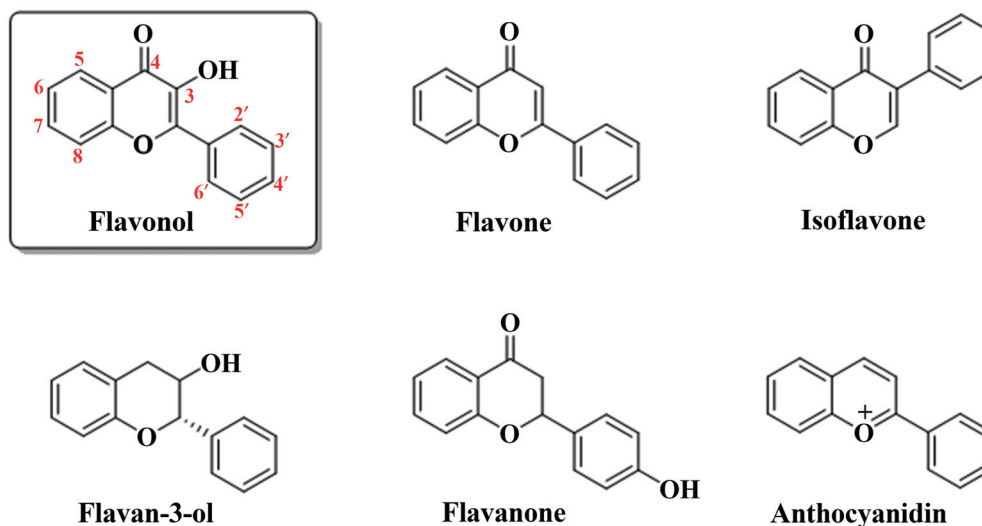
ฟลาโวนอล ฟลาโวน ฟลาวาโนน และไอโซฟลาโวน เป็นสารประกอบชนิดหนึ่งในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ [1] - [3] โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอลจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับฟลาโวนแต่จะแตกต่างกันโดยที่ฟลาโวนอลจะมีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) อยู่ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่สามในโครงสร้างดังรูปที่ 1 [4] - [6] ฟลาโวนและฟลาโวนอลสามารถพบได้ในพืชโดยโครงสร้างที่พบมากที่สุดในพืชคือกลุ่มโครงสร้างที่มี β -ring hydroxylation ในตำแหน่งที่ 3' และ 4' ทั้งสองตำแหน่ง และกลุ่มโครงสร้างที่มีอยู่ตำแหน่งที่ 4' เท่านั้น (รูปที่ 1) มีชื่อเรียกว่า เควอซีทิน (Quercetin) และแคมป์เฟอร์อล (Kaempferol) ตามลำดับ [4], [7] พืชสังเคราะห์ฟลาโวนอลขึ้นเพื่อตอบสนองต่อจุลินทรีย์และการติดเชื้อ [8] - [11] รวมไปถึงทำหน้าที่ตอบสนองต่อแสงอาทิตย์และเพื่อกรองแสง UV-B ในขณะที่พืชทำการสังเคราะห์แสงซึ่งจะสะสมอยู่บนผิวชั้นนอกของเนื้อเยื่อพืช [12] - [13]

ในธรรมชาติสารประกอบฟลาโวนอลมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และทางด้านเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [14] - [15] ด้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านมะเร็ง [9] - [10], [16] ในปัจจุบันอนุพันธ์ของฟลาโวนอลยังถูกนำมาใช้ทางด้านเภสัชกรรม เช่น ยาที่มีส่วนผสมของ P-vitamin [17] - [19] นอกจากนี้ฟลาโวนอลจัดเป็นสีย้อมชนิดหนึ่งที่ได้จากธรรมชาติโดยให้สีเป็นสีเหลืองพบได้ในพืชต่าง ๆ ทั่วโลก [17] แต่ในธรรมชาติฟลาโวนอลมีปริมาณจำกัด จึงไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ทำสีย้อม และจะต้องบริโภคในปริมาณมากจึงจะเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ฟลาโวนอลจาก 2-ไฮดรอกซีอะซิโตน (2-hydroxyacetophenone) กับแอลดีไฮด์ [9] - [10], [20] เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของมนุษย์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ยังได้รับความสนใจในด้านการใช้เป็นสารเรืองแสง [21] - [23] ซึ่งเกิดจากโครงสร้างภายในโมเลกุลที่อยู่ในสภาวะกระตุ้นเกิดการถ่ายโอนโปรตอน (Excited State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT)) [24] จึงส่งผลให้เกิดไอโซเมอร์ไรเซชันของฟลาโวนอยด์โดยสารเปลี่ยนโครงสร้างจากไอโซเมอร์หนึ่งไปเป็นอีกไอโซเมอร์หนึ่ง จากสภาวะพื้น (Normal Form) ไปสภาวะกระตุ้น (Phototautomer Form) หลังจากไอโซเมอร์เข้าสู่สภาวะกระตุ้นแล้วก็จะกลับคืนสู่สภาวะพื้น พร้อมกับการปล่อยโปรตอนออกมาในพลังงานที่ต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงมีการปล่อยพลังงานในรูปแบบสเปกตรัมการเรืองแสงของฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างละลายต่าง ๆ ซึ่งจะปรากฏพีคที่แตกต่างกันสองพีค ฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปปกติ และ Tautomeric Forms [17], [25] - [27] ตำแหน่งสูงสุดของการเรืองแสงจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของความเข้มข้น และช่วงของตัวอย่างที่ละลายหรือนิวคลีโอฟิลิกซิตีของตัวทำละลาย [17], [28]

3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one เป็นสารฟลาโวนอยด์สังเคราะห์ที่ถูกค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ ซึ่งมีระบบคอนจูเกตที่มากของวง Pyrene ทำให้มีความไวต่อแสงสูงภายใต้แสงที่มองเห็นได้ [29] และมีวิธีการสังเคราะห์ที่ง่ายให้ร้อยละผลผลิตที่สูง ซึ่งเหมาะแก่การนำมาศึกษาและพัฒนาไปเป็นสีย้อมสำหรับการตรวจจับกับเซลล์มะเร็งในอนาคต

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ รวมถึง 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการเรืองแสง และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีความสำคัญทางด้านการแพทย์เป็นอย่างมาก 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ยังไม่เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวาง และยังไม่มีการศึกษาทางด้านสมบัติทางแสงและด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอย่างลึกซึ้ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาสมบัติทางแสงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพื่อพัฒนาสารสังเคราะห์ไปสู่ทางการแพทย์เพื่อลดอันตรายจากภาวะปริมาณอนุมูลอิสระสูงในร่างกาย [17]



รูปที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ ฟลาโวน ไอโซฟลาโวน ฟลาเวโน-3-อล ฟลาเวโนน และแอนโทไซยานิดิน ที่เป็นสารประกอบในกลุ่มของฟลาโวนอยด์

วัตถุประสงค์การศึกษา

เพื่อศึกษาสมบัติทางแสง และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโพรบฟลูออเรสเซนต์ ฟลาโวนอยด์ (3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one)

วิธีการดำเนินการศึกษา

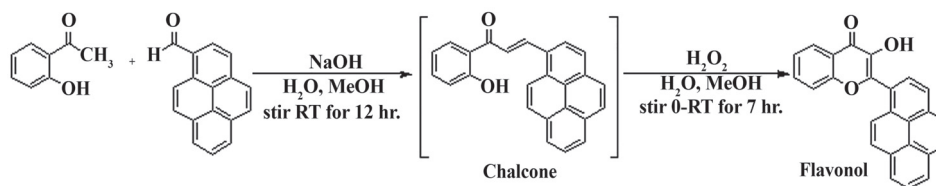
1. วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการสังเคราะห์และวิเคราะห์ **3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one** อบอุ่นเครื่องแก้วที่แห้งที่อุณหภูมิ 100 °C รีเอเจนต์และตัวทำละลายทั้งหมดซื้อมาจากบริษัท Sigma Aldrich, TCI (โตเกียว, ญี่ปุ่น), Carlo Erba (Emmendingen, เยอรมนี), Acros (Geel, เบลเยียม), Merck (Rahway, NJ, USA) และนำมาใช้โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์เพิ่ม สำหรับสารสังเคราะห์ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีจะใช้ซิลิกาเจลสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Carlo Erba) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่นิ่ง ส่วนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) จะใช้ซิลิกาเจล 60 F254 (Merck) และนำไปส่องภายใต้ดูยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

การวัดค่าการดูดกลืนแสง และการเรืองแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV-vis (Agilent Technologies Cary 300, Santa Clara, CA, USA) และเครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เรืองแสง (PerkinElmer LS55, Liantrisant, UK) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) (^1H และ ^{13}C NMR) ถูกใช้ที่อุณหภูมิห้องโดยเครื่อง Bruker (500 MHz) (Rheinstetten ประเทศเยอรมนี) โดยมี TMS เป็นข้อมูลอ้างอิง ภายใต้เงื่อนไข ESI แมสสเปกโตรเมตรีความละเอียดสูง (HRMS) จะถูกบันทึกบนแมสสเปกโตรมิเตอร์

2. การสังเคราะห์ **3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one (BCD-29)** [31]

ซึ่ง 2-hydroxyacetophenone (2.73 กรัม, 2.4 มิลลิโมล, 20 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 150 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายเมทานอลลงไป 40 มิลลิลิตร ใส่แมกเนติกบาร์ลงไปแล้วปิดด้วยจุกปิดแก้ว จากนั้นนำไปกวนบนเครื่อง Stirrer ให้สารละลายผสมจนเข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย 60 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำลงไป 40 มิลลิลิตรจะมีความร้อนเกิดขึ้นจนสารละลายต่อไปจนอุณหภูมิลดลงมาเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วทำการเติม 4.6 กรัม (20 มิลลิโมล) ของ pyrene-1-carbaldehyde ลงไปจนต่อเป็นเวลา 12 ชั่วโมงจนกว่าปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์เติมน้ำเย็นลงไป 50 มิลลิลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไปเพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 2 จะได้ตะกอนของแข็งสีเหลืองแล้วนำไปกรองล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อกำจัดกรดจนหมด หลังจากนั้นเติมสารละลายไดคลอโรมีเทนลงไปเพื่อทำการสกัดปริมาณ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์คาร์บอเนต 100 มิลลิลิตร นำสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทนมาเติมสารดูดความชื้นโซเดียมซัลเฟต แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ จากนั้นจะทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึกโดยใช้เอทานอลจะได้ผลิตภัณฑ์ Chalcone (รูปที่ 2) หากเช็ค TLC แล้วสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์จะทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟีโดยใช้สารละลายผสมที่ชะล้างคอลัมน์ เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน

นำ Chalcone 30 มิลลิโมล ใส่ลงไปในขวดก้นกลมขนาด 150 มิลลิลิตร แล้วเติม 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลลงไป 40 มิลลิลิตร นำสารผสมที่ได้ใส่ลงไปในอ่างน้ำแข็งและกวนให้ สารละลายผสมเข้ากัน จากนั้นเติม 30 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป 30 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ เมื่อสารผสมเข้ากันแล้วให้นำออกจากอ่างน้ำแข็งและกวนต่อไปอีก 7 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จะเริ่มสังเกตเห็น ของแข็งค่อย ๆ ก่อตัวขึ้น เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะนำตะกอนที่ได้มากรองแล้วเอามาล้างด้วยอีเทอร์ และนำตะกอนที่ได้ไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจากการสังเคราะห์ (Flavonol) แห้งแล้วนำมาชั่ง เพื่อคำนวณร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารประกอบ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one

3. การหามวลโมเลกุลโดยเทคนิคมาลดี อิมเมจิง-ทอพ แมสสเปกโตรมิเตอร์

ชั่ง 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ประมาณ 1 มิลลิกรัม ลงไปในแอพเพนดรอป ขนาด 2 mL แล้วเติมตัวทำละลายไคลโอโรฟอร์มลงไป 1.5 mL เขย่าให้สารละลายผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นจะทำการปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 1 μ L ผสมกับสารละลายเมทริกซ์ แล้วทำการปิเปตสารละลายผสม 0.5 μ L ใส่ลงบนแผ่นแท็กกลาไรซินิมและทำให้แห้ง หลังจากนั้นนำแผ่นแท็กกลาไปเข้าเครื่อง MALDI-TOF Mass Spectrometer (JEOL JMS-S3000) แล้วฉายรังสีด้วยเลเซอร์ UV (ความยาวคลื่นประมาณ 350 นาโนเมตร) หลาย ๆ จุดบนแผ่นแท็กกลาที่มีสารตัวอย่างเครื่องจะบันทึกผลเป็นสเปกตรัมและระบุน้ำหนักโมเลกุล

4. การศึกษาโครงสร้างสารโดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (NMR)

ชั่ง 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one 30 มิลลิกรัมใส่ลงไปในแอพเพนดรอปขนาด 2 mL หลังจากนั้นเติมตัวทำละลาย Deuterated Chloroform ลงไป 1 mL เขย่าให้สารละลายผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 0.5 mL แล้วเติมลงไปในหลอด NMR Tube ปิดฝาหลอด แล้วนำไปรันหาโปรตอน และคาร์บอนของสาร 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ด้วยเครื่อง NMR ความถี่ 500 MHz

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางแสง

เตรียม Stock Solution ของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ให้มีความเข้มข้น 1,000 mM ด้วยตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) หลังจากนั้นนำฟอยล์มาพันรอบ ๆ ขวดสารละลาย เพื่อไม่ให้โดนแสงก่อนนำไปทดสอบ

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Agilent Technologies Cary 300, Santa Clara, CA, USA) จะตั้งค่าที่เครื่องเป็นแบบสแกนสเปกตรัมหลังจากนั้นจะทำการเตรียมตัวอย่างโดยทำการปิเปตตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เช่น อะซิโตนไครล์ ไคลโอโรฟอร์ม ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เอทานอล ฯลฯ มา 2,475 μ L ลงไปใน Cuvette ขนาด 3,000 μ L หลังจากนั้นทำการปิเปตสารละลายจาก Stock Solution มา 25 μ L ใส่ลงไปผสมกับตัวทำละลายที่เตรียมไว้ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปวัดค่า ก่อนทำการวัดค่าของแต่ละตัวทำละลายทุกครั้งจะต้องทำการวัดค่าของ Blank ก่อนเสมอโดยใช้ตัวทำละลายที่ปราศจากสารละลายตัวอย่างเป็น Blank

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางแสงด้วยเครื่องโดยใช้เครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เรืองแสง (PerkinElmer LS55, Liantrisant, UK) โดยทำการตั้งค่าการกระตุ้นแสงที่ 355 nm เริ่มสแกนสเปกตรัมตั้งแต่ 200 - 750 nm เมื่อตั้งค่าเครื่องเสร็จแล้วจึงจะทำการเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยการเตรียมสารละลายตัวอย่าง จะทำการเตรียมเช่นเดียวกันกับการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการวัดค่า Blank เช่นกัน

6. การทดสอบฤทธิ์ของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one (BCD-29)

6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay [30]

นำ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid) หรือวิตามินซี เตรียมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.25 mM ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี (50,000 μ g/mL) โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 125 250 500 1,000 2,500 5,000 และ 10,000 μ g/mL ตามลำดับ

เตรียมสารตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้ให้มีความเข้มข้น 125 250 500 1,000 2,500 5,000 และ 10,000 μ g/mL โดยนำสารสกัด 20 μ L ใส่ลง 96 Well Plate จากนั้นเติมสารละลายที่มีสารละลาย DPPH 180 μ L ผสมกับสารมาตรฐาน สารสกัดตัวอย่าง หรือ Blank ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ยี่ห้อ BioTek รุ่น Synergy H1 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณร้อยละ Free Radical Scavenging Activity หรือ

% Scavenging Activity ซึ่งค่าที่ได้จะหมายถึงเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือค่าที่แสดงถึงการจับกันระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ ซึ่งหาได้จากสูตร

$$\text{Scavenging Activity (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A} \times 100$$

เมื่อ

A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Control

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

6.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method [31]

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic Acid) 0 - 10,000 $\mu\text{g/mL}$ โดยเจือจางด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 125 250 500 1,000 2,500 5,000 และ 10,000 $\mu\text{g/mL}$

เตรียมสารสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์โดยเจือจางด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ตามความเข้มข้นของกรดแกลลิก จากนั้นนำสารสังเคราะห์ 20 μL ใส่ลง 96 Well Plate จากนั้นเติมสารละลายที่มีสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) (w/v) 100 μL ลงใน 96 Well Plate ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นเติม 15 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate; Na_2CO_3) (w/v) ปริมาตร 80 μL ตั้งทิ้งไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ยี่ห้อ BioTek รุ่น Synergy H1 แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด

6.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content) โดยวิธี Aluminium Chloride Colorimetric Method

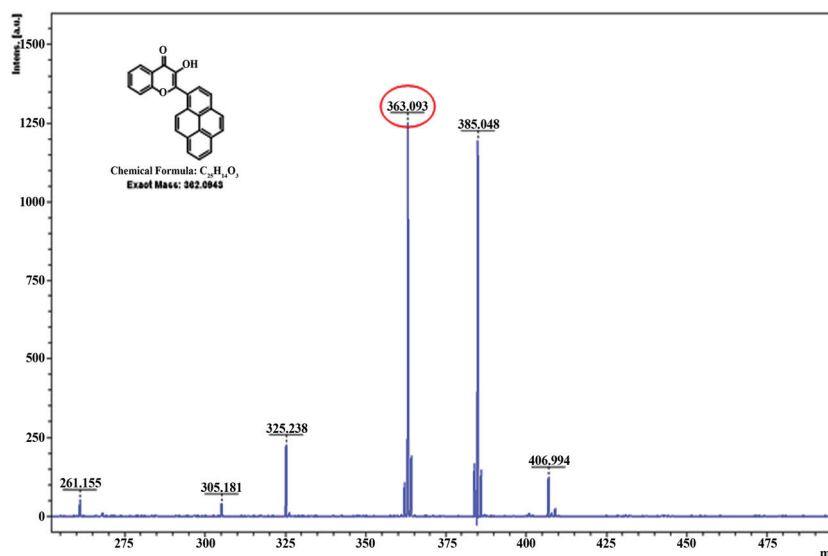
เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอซีทิน 0 - 10,000 $\mu\text{g/mL}$ โดยเจือจางด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 125 250 500 1,000 2,500 5,000 และ 10,000 $\mu\text{g/mL}$

นำสารสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เจือจางด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ตามความเข้มข้นของเคอซีทิน จากนั้นเติมลงใน 96 Well Plate ปริมาตร 20 μL ที่มีน้ำกลั่น 40 μL ตามด้วยโซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 μL ตั้งไว้นาน 5 นาที ตามด้วยอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 μL ตั้งไว้นาน 6 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 μL นำมาวัดค่า OD ทันทีที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้เคอซีทินเป็น Positive Control

ผลการวิจัย

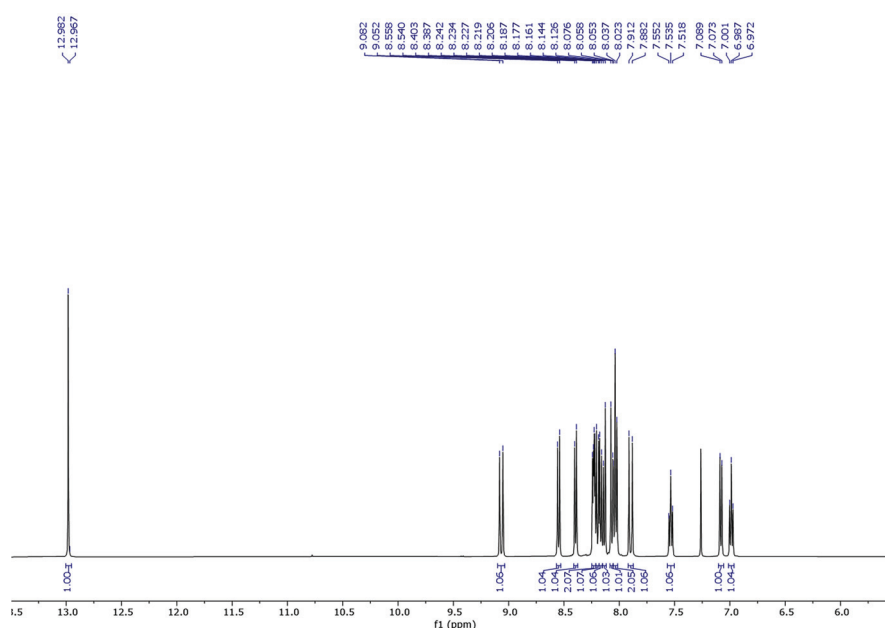
1. มอลติ อิมเมจิง-ทอพ แมสสเปกโตรมิเตอร์ และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)

การศึกษาการหามวลโมเลกุลของสารสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one โดยใช้เทคนิคมอลติ อิมเมจิง-ทอพ แมสสเปกโตรมิเตอร์ เทียบมวลโมเลกุลของโครงสร้างที่หาได้จากสูตรโมเลกุลซึ่งมีค่าเท่ากับ 362.0943 พบว่าพีคของสารสังเคราะห์ที่ได้รับการบันทึกปรากฏพีคของไอออน $\text{C}_{25}\text{H}_{14}\text{O}_3^+$ ที่ค่ามวลต่อประจุ (m/z) 363.093 (รูปที่ 3)



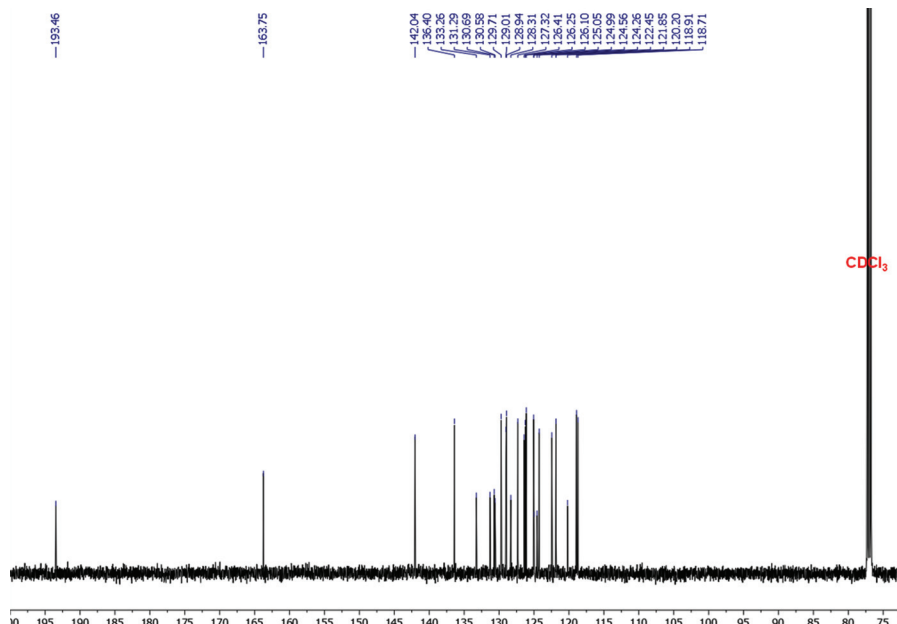
รูปที่ 3 สเปกตรัมมวลโมเลกุลของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ที่ได้จากการบันทึกโดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี

การศึกษาพิสูจน์โครงสร้างโมเลกุลของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one โดยอาศัยปรากฏการณ์การดูดกลืนพลังงานสนามแม่เหล็กในย่านความถี่สัญญาณวิทยุด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) ผลการศึกษาสมบัติเฉพาะของนิวเคลียสของโปรตอน (^1H) ที่ได้รับการบันทึกปรากฏพิคแสดงดังรูปที่ 4 และมีค่า Chemical Shift (δ) = ระยะห่างของสารที่พิจารณาจากสารอ้างอิง (Hz) หน่วยเป็น ppm ความถี่ของ NMR Spectrometer (MHz) ดังนี้ ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 12.98 (s, 1H), 9.07 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 8.40 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 5.0$, 5.0 Hz, 2H), 8.20 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 8.04 (t, $J = 10.0$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.99 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H)



รูปที่ 4 สเปกตรัมโปรตอนของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ที่ได้จากการบันทึกโดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^1H NMR) ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มดีวเทอเรต

ผลการศึกษสมบัติเฉพาะของนิวเคลียสของคาร์บอน (^{13}C) ที่ได้รับการบันทึกปรากฏพิคดังรูปที่ 5 และมีค่า Chemical Shift (δ) = ระยะห่างของสารที่พิจารณาจากสารอ้างอิง (Hz) หน่วยเป็น ppm ความถี่ของ NMR Spectrometer (MHz) ดังนี้ ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 193.5, 163.8, 142.0, 136.4, 133.3, 131.3, 130.7, 130.6, 129.7, 129.0, 128.9, 128.3, 127.3, 126.4, 126.3, 126.1, 125.1, 125.0, 124.6, 124.3, 122.5, 121.9, 120.2, 118.91, 118.7



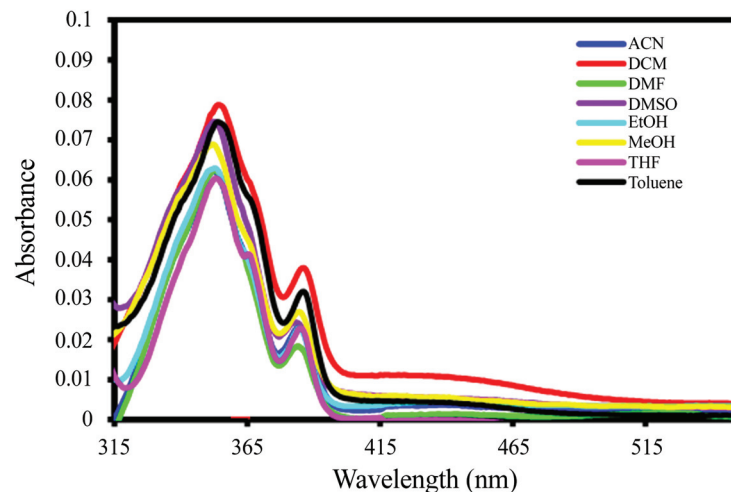
รูปที่ 5 สเปกตรัมคาร์บอนของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ที่ได้จากการบันทึกโดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{13}C NMR) ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มดิฟเทอเรต

2. คุณสมบัติทางแสง

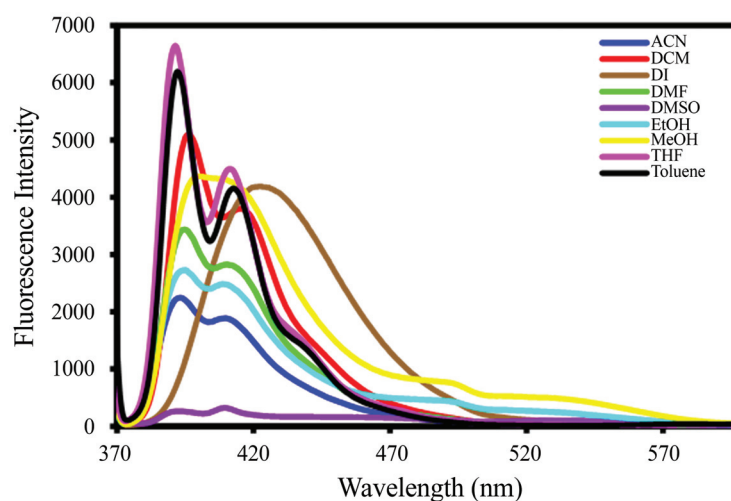
การศึกษาคุณสมบัติทางแสงของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ได้แก่ อะซิโตนไทรล์ (ACN) ไดคลอโรมีเทน (DCM) ไดเมทิลฟอล์มาไมด์ (DMF) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เอทานอล (EtOH) เมทานอล (MeOH) เตตระไฮโดรฟลูแรน (THF) และโทลูอีน (Toluene) ดังรูปที่ 6 และ 7 ซึ่งจะปรากฏพิคที่แตกต่างกันสองพิค คือฟลาโวนอลที่อยู่ในรูปปกติ และ Tautomeric Forms เทคนิค UV-Vis Absorption รูปที่ 6 พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร จากผลการทดลองการหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ได้นี้จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางแสงด้วยเทคนิคการวัดค่าการเปล่งแสงของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one รูปที่ 7 Fluorescent Spectra มีค่าการเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 418 นาโนเมตร (Excited at 355 nm) ซึ่งตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ Polarity Index อยู่ในช่วง 2.4 - 4 เช่น ไดคลอโรมีเทน โทลูอีน และเตตระไฮโดรฟลูแรน จะสามารถทำให้ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one มีการเปล่งแสงออกมาได้เข้มที่สุด (Fluorescence Intensity) ค่าการเปล่งแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 5,200 - 6,800

ฟลาโวนอล 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one มีขั้วต่ำจึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำซึ่งสัมพันธ์กับทฤษฎี Like Dissolves Like ดังนั้นเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเตรียมสารละลายจึงทำให้มีการเปล่งแสงออกมาได้เข้มที่สุด และเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วเพิ่มขึ้น Polarity Index อยู่ในช่วง 5.1 - 7.2 เช่น อะซิโตนไทรล์ ไดเมทิลฟอล์มาไมด์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เอทานอล และเมทานอล พบว่าจะมีค่าการเปล่งแสงลดลงมาเรื่อย ๆ ตามลำดับ

ความยาวคลื่นของแสงสีฟ้าที่อยู่ในช่วงประมาณ 400 - 500 นาโนเมตร ซึ่งแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้จะมีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการรักษาภาวะบิลิรูบินในเลือดสูง แต่ต้องควบคุมปริมาณความเข้มแสงให้เหมาะสมเนื่องจากแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้มีพลังงานสูงทำให้สามารถในการทะลุลงจอบุรุษตาได้ จากการทดลอง 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one มีค่าการเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 418 นาโนเมตร ซึ่งอาจจะมีมีการนำมาประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ต่อไปได้ในอนาคต



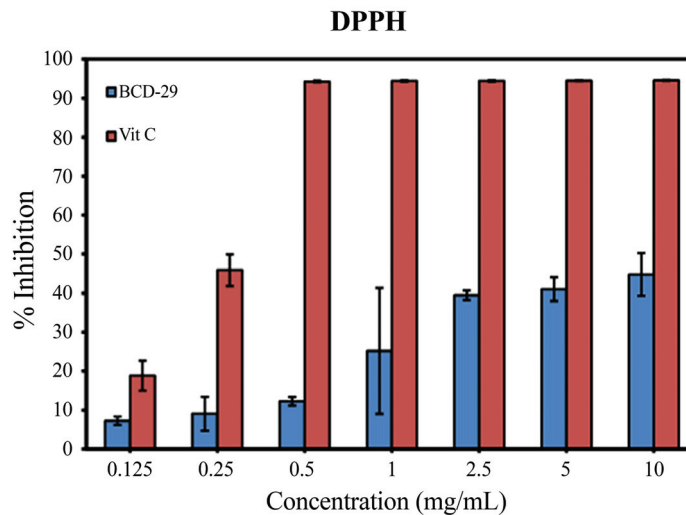
รูปที่ 6 UV-Vis Absorption ของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ที่มีความเข้มข้น 10 μM ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน



รูปที่ 7 Fluorescent Spectra ของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one ที่มีความเข้มข้น 10 μM ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันโดย Excitation Wavelength ที่ 355 nm

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one

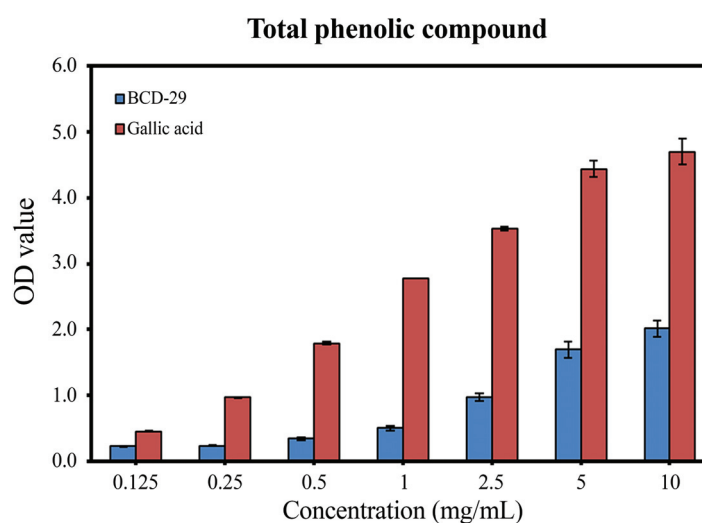
การศึกษาการต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอลที่สังเคราะห์ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay พบว่าความเข้มข้นของวิตามินซีที่ 0.25 mg/mL มีค่าเปอร์เซ็นต์การต้านออกซิเดชันของ DPPH Radicals อยู่ที่ 45.9 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one (BCD-29) ที่ความเข้มข้น 1 2.5 5 และ 10 mg/mL มีค่าเปอร์เซ็นต์การต้านออกซิเดชันเป็น 25.2 39.5 41.0 และ 44.7 ตามลำดับ ดังรูปที่ 8 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสังเคราะห์ฟลาโวนอลมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับวิตามินซี แต่ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ใช้สูงกว่าวิตามินซี 40 เท่า



รูปที่ 8 กราฟแสดงร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้น (mg/mL) ของสารสังเคราะห์ ฟลาโวนอลเปรียบเทียบกับวิตามินซี

4. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one

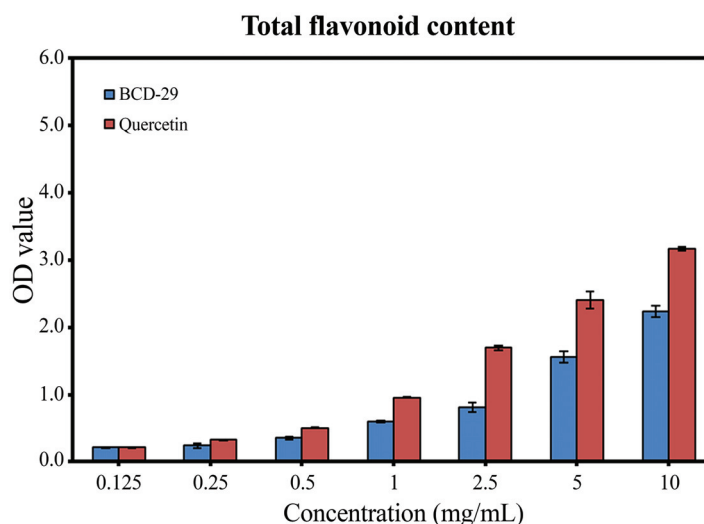
การศึกษาผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสังเคราะห์ฟลาโวนอลแสดงให้เห็นถึง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในตัวอย่างเมื่อเทียบกับกรดแกลลิกที่ใช้เป็น Positive Control (รูปที่ 9) จากผลการทดลองความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่ 0.25 0.5 1 และ 2.5 mg/mL มีค่าการดูดกลืนแสงของ สารละลายตัวอย่าง หรือ Optical Density (OD) อยู่ที่ 0.965 1.790 2.775 และ 3.932 ตามลำดับ โดยค่า OD ที่สูงขึ้นแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้สารสังเคราะห์ฟลาโวนอลที่ ความเข้มข้นเดียวกันกับกรดแกลลิกมีค่า OD อยู่ที่ 0.232 0.337 0.499 และ 0.964 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ สารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบในสารสังเคราะห์ฟลาโวนอลที่ความเข้มข้น 2.5 mg/mL จะมีค่า OD ใกล้เคียงกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 0.25 mg/mL ของกรดแกลลิกโดยมีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.7971x - 0.4886$, $R^2 = 0.9907$ พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.239 ± 0.043 mgGAE/gDW ดังตารางที่ 1



รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณค่าการดูดกลืนแสงของสารสังเคราะห์ฟลาโวนอลที่แสดงถึงปริมาณสาร Phenolic Compounds กับความเข้มข้น (mg/mL) เปรียบเทียบกับกรดแกลลิก

5. การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one

การศึกษาการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสังเคราะห์ฟลาโวนอลเทียบกับสารมาตรฐาน เควอซีทิน (Quercetin) มีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.6797x - 0.2929$, $R^2 = 0.9927$ ผลพบว่ามีความเท่ากับ 1.312 ± 0.014 mgCE/gDW ดังตารางที่ 1 ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้น 0.125 mg/mL ของสารสังเคราะห์ จะมีค่า OD เท่ากับสารมาตรฐาน และจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 10 ถ้าเทียบจากผลการวิเคราะห์ข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณฟีนอลิกรวม (1.239 ± 0.043 mgGAE/gDW) มีค่าน้อยกว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (1.312 ± 0.014 mgCE/gDW) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอลซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์



รูปที่ 10 กราฟแสดงปริมาณค่าการดูดกลืนแสงของสารสังเคราะห์ฟลาโวนอลที่แสดงถึงปริมาณสาร Flavonoid กับความเข้มข้น (mg/mL) เปรียบเทียบกับเควอซีทิน (Quercetin)

ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) ของ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one

วิเคราะห์	ค่าการดูดกลืนแสง			
	1	2	3	เฉลี่ย±S.D.
TPC (mgGAE/gDW)	0.456	0.540	0.500	0.499±0.034
	ปริมาณรวม (mg/gDW)			
	1	2	3	เฉลี่ย±S.D.
	1.185	1.290	1.240	1.239±0.043
TFC (mgCE/gDW)	ค่าการดูดกลืนแสง			
	1	2	3	เฉลี่ย±S.D.
	0.586	0.603	0.608	0.599±0.009
	ปริมาณรวม (mg/gDW)			
	1	2	3	เฉลี่ย±S.D.
	1.293	1.318	1.325	1.312±0.014

All data were expressed as mean ±S.D. for 3 replications

สรุปผลการวิจัย

โดยสรุปสารสังเคราะห์ 3-hydroxy-2-(pyren-1-yl)-4H-chromen-4-one มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 10 mg/mL เท่ากับ 44.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้วิตามินซีที่ 0.25 mg/mL มีปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 1.239 ± 0.043 mgGAE/gDW และ 1.312 ± 0.014 mgCE/gDW มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร และค่าการเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 418 นาโนเมตร ซึ่งความยาวคลื่นในช่วงนี้มีบทบาทสำคัญทางด้านการแพทย์ ดังนั้นสารสังเคราะห์ในกลุ่มของฟลาโวนอลเป็นอีกหนึ่งกลุ่มที่ยังคงมีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์ในอนาคต

References

- [1] Herrmann, K. (1976). Flavonols and Flavones in Food Plants: A Review. **International Journal of Food Science & Technology**. Vol. 11, Issue 5, pp. 433-448. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1976.tb00743.x
- [2] Mahmud, A. R., Ema, T. I., Siddiquee, M. F.-R., Shahriar, A., Ahmed, H., Mosfeq-Ul-Hasan, M., Rahman, N., Islam, R., Uddin, M. R., and Mizan, M. F. R. (2023). Natural Flavonols: Actions, Mechanisms, and Potential Therapeutic Utility for Various Diseases. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**. Vol. 12, p. 47. DOI: 10.1186/s43088-023-00387-4
- [3] Hollman, P. C. H. and Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, Flavones and Flavanols-Nature, Occurrence and Dietary Burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Vol. 80, Issue 7, pp. 1081-1093. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G
- [4] Şöhretoğlu, D. and Sari, S. (2020). Flavonoids as Alpha-Glucosidase Inhibitors: Mechanistic Approaches Merged with Enzyme Kinetics and Molecular Modelling. **Phytochemistry Review**. Vol. 19, Issue 5, pp. 1081-1092. DOI: 10.1007/s11101-019-09610-6
- [5] Gervasi, T., Calderaro, A., Barreca, D., Tellone, E., Trombetta, D., Ficarra, S., Smeriglio, A., Mandalari, G., and Gattuso, G. (2022). Biotechnological Applications and Health-Promoting Properties of Flavonols: An Updated View. **International Journal of Molecular Sciences**. Vol. 23, Issue 3, p. 1710. DOI: 10.3390/ijms23031710
- [6] Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., and Jin, B. (2022). Plant Flavonoids: Classification, Distribution, Biosynthesis, and Antioxidant Activity. **Food Chemistry**. Vol. 383, DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132531
- [7] Ojha, M. D., Yadav, A., and Hariprasad, P. (2023). Analyzing the Potential of Selected Plant Extracts and Their Structurally Diverse Secondary Metabolites for α -glucosidase Inhibitory Activity: *in vitro* and *in silico* Approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**. Vol. 41, Issue 19, pp. 9523-9538. DOI: 10.1080/07391102.2022.2142847
- [8] Kumar, S. and Pandey, A. K. (2013). Phenolic Content, Reducing Power and Membrane Protective Activities of *Solanum xanthocarpum* Root Extracts. **Vegetos**. Vol. 26, Issue 1, pp. 301-307. DOI: 10.5958/j.2229-4473.26.1.043
- [9] Kumar, S. and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**. Vol. 2013, Article ID 162750, pp. 1-16. DOI: 10.1155/2013/162750

- [10] Boudérias, S., Teszlák, P., Jakab, G., and Körösi, L. (2020). Age-and Season-Dependent Pattern of Flavonol Glycosides in Cabernet Sauvignon Grapevine Leaves. **Scientific Reports**. Vol. 10, Issue 1, Article Number 14241. DOI: 10.1038/s41598-020-70706-7
- [11] Liu, L., Gregan, S., Winefield, C., and Jordan, B. (2015). From UVR8 to Flavonol Synthase: UV-B-Induced Gene Expression in Sauvignon Blanc Grape Berry. **Plant, Cell & Environment**. Vol. 38, Issue 5, pp. 905-919. DOI: 10.1111/pce.12349
- [12] Gregan, S. M., Wargent, J. J., Liu, L., Shinkle, J., Hofmann, R., Winefield, C., Trought, M., and Jordan, B. (2012). Effects of Solar Ultraviolet Radiation and Canopy Manipulation on the Biochemical Composition of Sauvignon Blanc Grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. Vol. 18, Issue 2, pp. 227-238. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2012.00192.x
- [13] Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., and Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol Profiles of Vitis vinifera Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 55, Issue 3, pp. 992-1002. DOI: 10.1021/jf062800k
- [14] Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**. Vol. 63, Issue 7, pp. 1035-1042. DOI: 10.1021/np9904509
- [15] Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. **Plant Science**. Vol. 196, pp. 67-76. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014
- [16] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. Vol. 13, Issue 10, pp. 572-584. DOI: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5
- [17] Bondar, O. P., Pivovarenko, V. G., and Rowe, E. S. (1998). Flavonols-New Fluorescent Membrane Probes for Studying the Interdigitation of Lipid Bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**. Vol. 1369, Issue 1, pp. 119-130. DOI: 10.1016/S0005-2736(97)00218-6
- [18] Klymchenko, A. S., Ozturk, T., and Demchenko, A. P. (2002). Synthesis of Furanochromones: A New Step in Improvement of Fluorescence Properties. **Tetrahedron Letters**. Vol. 43, Issue 39, pp. 7079-7082. DOI: 10.1016/S0040-4039(02)01547-2
- [19] Chou, P. T., Martinez, M. L., and Clements, J. H. (1993). Reversal of Excitation Behavior of Proton-Transfer vs. Charge-Transfer by Dielectric Perturbation of Electronic Manifolds. **The Journal of Physical Chemistry**. Vol. 97, Issue 11, pp. 2618-2622
- [20] Pandey, A. K. (2007). Anti-Staphylococcal Activity of a Pan-Tropical Aggressive and Obnoxious Weed Parthenium Histerophorus: An *in vitro* Study. **National Academy Science Letters**. Vol. 30, Issue 11/12, 383-386.
- [21] Reszka, M., Serdiuk, I. E., Kozakiewicz, K., Nowacki, A., Myszk, H., Bojarski, P., and Liberek, B. (2020). Influence of a 4'-Substituent on the Efficiency of Flavonol-Based Fluorescent Indicators of β -Glycosidase Activity. **Organic & Biomolecular Chemistry**. Vol. 18, Issue 38, pp. 7635-7648
- [22] Sentchouk, V. and Bondaryuk, E. (2007). Fluorescent Analysis of Interaction of Flavonols with Hemoglobin and Bovine Serum Albumin. **Journal of Applied Spectroscopy**. Vol. 74, Issue 5, pp. 731-737. DOI: 10.1007/s10812-007-0117-5

- [23] Höfener, S., Kooijman, P. C., Groen, J., Ariese, F., and Visscher, L. (2013). Fluorescence Behavior of (Selected) Flavonols: A Combined Experimental and Computational Study. **Physical Chemistry Chemical Physics**. Vol. 30, pp. 12572-12581. DOI: 10.1039/C3CP44267E
- [24] Ameer-Beg, S., Ormson, S. M., Brown, R. G., Matousek, P., Towrie, M., Nibbering, E. T., Foggi, P., and Neuwahl, F. V. (2001). Ultrafast Measurements of Excited State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) in Room Temperature Solutions of 3-Hydroxyflavone and Derivatives. **The Journal of Physical Chemistry A**. Vol. 105, Issue 15, pp. 3709-3718. DOI: 10.1021/jp0031101
- [25] Ormson, S. M., Brown, R. G., Vollmer, F., and Rettig, W. (1994). Switching Between Charge-and Proton-Transfer Emission in the Excited State of a Substituted 3-Hydroxyflavone. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. Vol. 81, Issue 2, pp. 65-72. DOI: 10.1016/1010-6030(94)03778-7
- [26] Ameer-Beg, S., Ormson, S. M., Poteau, X., and Brown, R. G., Foggi, P., Bussotti, L., and Neuwahl, F. V. (2004). Ultrafast Measurements of Charge and Excited-State Intramolecular Proton Transfer in Solutions of 4'-(N, N-dimethylamino) Derivatives of 3-Hydroxyflavone. **The Journal of Physical Chemistry A**. Vol. 108, Issue 34, pp. 6938-6943. DOI: 10.1021/Jp048512d
- [27] Doroshenko, A. O., Posokhov, E. A., Verezubova, A. A., and Ptyagina, L. M. (2000). Excited State Intramolecular Proton Transfer Reaction and Luminescent Properties of the Ortho-Hydroxy Derivatives of 2, 5-diphenyl-1, 3, 4-oxadiazole. **Journal of Physical Organic Chemistry**. Vol. 13, Issue 5, pp. 253-265. DOI: 10.1002/1099-1395(200005)13:5<253::AID-POC238>3.0.CO;2-D
- [28] Swinney, T. and Kelley, D. (1993). Proton Transfer Dynamics in Substituted 3-Hydroxyflavones: Solvent Polarization Effects. **The Journal of Chemical Physics**. Vol. 99, Issue 1, pp. 211-221. DOI: 10.1063/1.465799
- [29] Tehfe, M.-A., Dumur, F., Xiao, P., Graff, B., Morlet-Savary, F., Fouassier, J.-P., Gigmes, D., and Lalevée, J. (2013). New Chromone Based Photoinitiators for Polymerization Reactions Under Visible Light. **Polymer Chemistry**. Vol. 4, Issue 15, pp. 4234-4244. DOI: 10.1039/C3PY00536D
- [30] Singsai, K., Sakdavirote, A., Wechpanishkitkul, K., and Moonsamai, A. (2020). The Comparison of Phenolic Compounds, Flavonoids and Antioxidant Activities of the Ethanolic Extracts of Shoots, Leaves, Fruits and Seeds of *Leucaena Leucocephala*. **Naresuan Phayao Journal**. Vol. 13, No. 3, pp. 66-73
- [31] Blainski, A., Lopes, G., and Mello, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**. Vol. 18, pp. 6852-6865. DOI: 10.3390/molecules18066852