พฤกษทางเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการต้านอนุมูลอิสระของบัวฉัตรขาว

ณพัฐอร บัวฉุน[1*]

Received : August 21, 2019
Revised : October 14, 2019
Accepted : December 23, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤกษทางเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการต้านอนุมูลอิสระของบัวฉัตรขาวทั้งแบบสดและแบบแห้ง โดยนำเกสร ใบ ก้านดอกดอก รังไข่ และกลีบดอกทั้งแบบสดและแบบแห้งของบัวฉัตรขาว ทำการสกัดด้วยเอทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลของบัวฉัตรขาวแบบสดและแบบแห้งจะพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน และเทอร์ปีนอยด์ สารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวแบบสดและแบบแห้งในเกสรมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด เท่ากับ 798.00 และ 607.60 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด และ 69.82 และ 65.25 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH free radical scavenging พบว่าสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวแบบสดและแบบแห้งในเกสรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.03 และ 1.99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : พฤกษทางเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระ บัวฉัตรขาว

[1] สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี
[*] ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: napattaorn@vru.ac.th

PHYTOCHEMICAL TOTAL PHENOLIC CONTENT TOTAL FLAVONOID CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM *NELUMBO NUCIFERA* GAERTN

Napattaorn Buachoon[1*]

Abstract

The aim of present study is to screen the phytochemical, total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* Gaertn from both fresh and dried. The *Nelumbo nucifera* Gaertn both fresh and dried such as pollen leaf stalk ovary and petal extraction by ethanol. The crude extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn analysis total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity using DPPH Radical Scavenging method by UV-VIS Spectrophotometer. In this study, the Phytochemical screening of *Nelumbo nucifera* Gaertn extracts from both fresh and dried were flavonoids, coumarins, saponin, tannins, phlobatannins, and terpenoids. The extract both fresh and dried *Nelumbo nucifera* Gaertn showed the highest total phenolic content and total flavonoid content which was of about 798.00 and 607.60 mg GAE/g extract and of about 69.82 and 65.25 mg QE/g extract, respectively. The antioxidant activity using DPPH free radical scavenging method extracts of both fresh and dried *Nelumbo nucifera* Gaertn pollen is the highest antioxidant activity with EC_{50} values of 2.03 และ 1.99 mg/mL, respectively.

Keywords : Phytochemical, Total Phenolic Content, Antioxidant activity, *Nelumbo nucifera* Gaertn

1Chemistry Program , Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage

**Corresponding author,e-mail: napattaorn@vru.ac.th*

บทนำ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นสารที่ช่วยต่อต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระ (Free Radicals) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกาย ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถพบได้จากหลากหลายรูปแบบตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นกระบวนออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม น้ำมันพืชที่มีกลิ่นเหม็นหืน ผลแอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ และหากเป็นในร่างกายจะพบได้จากการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน ซึ่งมาจากอาหารที่รับประทานเข้าไป การรับเอามลพิษทางอากาศ ควันบุหรี่ เชื้อโรค ฝุ่นละออง การรับเอารังสียูวีจากแสงแดด หรือแม้กระทั่งการหายใจก็สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ กลายเป็นสารอนุมูลอิสระล่องลอยอยู่ภายในร่างกายและสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ต่างๆ กลายเป็นอาการเจ็บป่วยและโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคปอด โรคตับแข็ง และโรคเบาหวาน เป็นต้น (ณพัฐอร บัวฉุน, 2558.

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตั้งอยู่ที่ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี และมีดอกไม้ประจำจังหวัดคือ บัวฉัตรขาว ชื่อวิทยาศาสตร์: *Nelumbo nucifera* Gaertn. ชื่อวงศ์: NYMPHACACEAE ชื่อสามัญ: Sacred lotus ซึ่งในปัจจุบันมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ได้จัดทำโครงการอนุรักษ์บัวหลวงของจังหวัดปทุมธานี ซึ่งบัวหลวงมีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ บัวพันธุ์ดอกสีชมพู (บัวแหลมชมพู) มีชื่อว่า ปทุม ปัทมา โกกระนต หรือโกกนุต บัวหลวงพันธุ์ดอกสีขาว (บัวแหลมขาว) มีชื่อว่า บุณฑริกหรือปุณฑริก บัวหลวงชมพูซ้อน (บัวฉัตรชมพู) มีชื่อว่า สัตตบงกช บัวหลวงขาวซ้อน (บัวฉัตรขาว) มีชื่อว่า สัตตบุษย์ โดยมีพื้นที่ปลูกบัวบริเวณเรือนไทยและบริเวณแปลงอนุรักษ์พันธุ์พืช

บัวฉัตรขาวจัดเป็นพืชสมุนไพรตามตำราแพทย์แผนไทย ทุกส่วนของบัวฉัตรขาวสามารถใช้ประกอบเป็นอาหาร และมีสรรพคุณใช้รักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ เช่น เกสรของบัวหลวงสามารถปรุงเป็นยาหอมมีสรรพคุณขับปัสสาวะ ลดระดับน้ำตาลในเลือด รากของบัวฉัตรขาวมี สรรพคุณ ระงับอาการท้องร่วง เหง้าและเมล็ดของบัวหลวงมีสรรพคุณเป็นยาบำรุงกำลัง รักษาอาการร้อนในกระหายน้ำ ขับเสมหะ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ดีบัวหรือต้นอ่อนของบัวหลวงมีสรรพคุณบำรุงหัวใจ ขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ ยางจากก้านดอกใบและก้านดอกดอกของบัวฉัตรขาวมีสรรพคุณแก้โรคท้องเดิน ใบของบัวฉัตรขาวมีสรรพคุณบำรุงร่างกายให้ชุ่มชื่น กลีบดอกของบัวฉัตรขาวมีสรรพคุณใช้เป็นยาฝาดสมาน (กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2542) นอกจากนี้ยังสามารถนำเอาส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาวมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางต่างๆ โดยมีสรรพคุณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านและลดริ้วรอย

จากความสำคัญดังกล่าวผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในบัวฉัตรขาว ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของบัวหลวงที่ปลูกในมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาว ได้แก่ เกสร ใบ ก้านดอกดอกรังไข่ และกลีบดอกทั้งแบบสดและแบบแห้ง

2. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสารต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาว ได้แก่ เกสร ใบ ก้านดอกดอกรังไข่ และกลีบดอกทั้งแบบสดและแบบแห้ง

3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาว ได้แก่ เกสร ใบ ก้านดอกดอกรังไข่ และกลีบดอกทั้งแบบสดและแบบแห้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสกัดสารจากบัวฉัตรขาว (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

นำตัวอย่างบัวฉัตรขาวได้แก่ เกสร ใบ ก้านดอกดอกรังไข่ และกลีบดอกทั้งแบบสดและแบบแห้ง มาหั่นให้ละเอียดด้วยมีด โดยทำการแยกแต่ละส่วนของบัวฉัตรขาว โดยจะแบ่งออกเป็น 10 ส่วน แล้วนำส่วนที่หันมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำบัวฉัตรขาว 10 ส่วนของบัวฉัตรขาวที่เป็นเกสร ใบ ก้านดอกดอก รังไข่ และกลีบดอกทั้งแบบสดและแบบแห้ง มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้การกรองด้วยสูญญากาศ นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ(Rotary Evaporator) จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล (Ethanol Extract) แล้วชั่งน้ำหนักด้วยสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างที่ได้ และเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากบัวฉัตรขาวโดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนดังนี้

1. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavoniods)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกองใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็กๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 5 หยด เขย่าแล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

2. การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมเตรียมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

3. การตรวจสอบคูมาลิน (Coumarin)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรเขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบคูมาริน

4. การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยช่างสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

5. การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายเฟอริคคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

6. การตรวจสอบโฟลบาแทนนิน (Phlobatannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (10% HCl) จำนวน 5 หยดเขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบโฟลบาแทนนิน

7. การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

8. การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรเขย่ากล่องส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดแกลเซียลแอซีติก (Glacail acetic Acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียร์รอยด์

9. การตรวจสอบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดแกลเซียลแอซีติก จำนวน 5 หยด เขย่าและค่อยค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Leite & Dourado, 2013: Lingkard & Singlaton, 1977)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1,000 ppm และ 100 ppm และเจือจางจนมีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก นำสารละลายที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (A760) หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาว

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminium trichloride (AlCl3) colorimetric โดยใช้เคอร์ซิติน เป็นสารมาตรฐาน เมื่อทำการผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน ที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (AlCl3 reagent) ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ในหน่วย

มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mg QE/g dried extract)

การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวโดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH Radical

1. ชั่งสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) 0.0125 กรัม ละลายด้วย 99.99% เอทานอล ใส่ในขวด วัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จนได้สารละลาย BHT และ BHA ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จะได้สารละลาย BHT ที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3. ชั่งสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาว 0.0125 กรัม ละลายด้วย 99.99% เอทานอล ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จนได้สารละลายสกัดหยาบบัวฉัตรขาว ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายสกัดหยาบบัวฉัตรขาว ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จะได้สารละลายสกัดหยาบบัวฉัตรขาว ที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เติมสารละลาย DPPH 6x10-5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. ปิเปตสารละลายสกัดหยาบบัวฉัตรขาว ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เติมสารละลาย DPPH 6 x 10-5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. คำนวณหา % DPPH Scavenging

7. พล็อตกราฟหาค่า IC50 เปรียบเทียบกับ BHA, BHT สกัดหยาบบัวฉัตรขาว

ผลการวิจัย

ผลจากสกัดสารจากบัวฉัตรขาว

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลของบัวฉัตรขาว

สารสกัดสด	ลักษณะของสารสกัดที่ได้	สารสกัดแห้ง	ลักษณะของสารสกัดที่ได้
เกสร	ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองเข้ม	เกสร	ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองเข้ม
ใบ	ของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้ม	ใบ	ของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้ม
กลีบดอก	ของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้ม	กลีบดอก	ของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้ม
รังไข่	ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองเข้ม	รังไข่	ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองเข้ม
ก้านดอก	ของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้ม	ก้านดอก	ของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 2 ร้อยละของสารสกัดหยาบเอทานอลของบัวฉัตรขาว

สารสกัดสด	ร้อยละสารสกัดหยาบ (%Yield)	สารสกัดแห้ง	ร้อยละสารสกัดหยาบ (%Yield)
เกสร	1.30	เกสร	1.09
ใบ	2.30	ใบ	2.02
กลีบดอก	1.06	กลีบดอก	1.29
รังไข่	1.93	รังไข่	1.14
ก้านดอก	2.91	ก้านดอก	2.63

ผลการสกัดจากบัวฉัตรขาวโดยวิธีการแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืดสีเขียวเข้มและสีเหลืองหนืดเข้ม เมื่อนำมาหาร้อยละของสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาว พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดจากบัวฉัตรขาวแบบสดของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอกคิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบเท่ากับ 1.30 2.30 1.06 1.93 และ 2.91 ตามลำดับ และ การสกัดจากบัวฉัตรขาวแบบแห้งของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอกคิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบเท่ากับ 1.09 2.02 1.29 1.14 และ 2.63 ตามลำดับ

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากบัวฉัตรขาวทั้งแบบสดและแบบแห้งโดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน พบว่าได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาว

สารพฤกษเคมีเบื้องต้น	สารสกัดหยาบแบบสด					สารสกัดหยาบแบบแห้ง				
	เกสร	ใบ	ก้านดอก	รังไข่	กลีบดอก	เกสร	ใบ	ก้านดอก	รังไข่	กลีบดอก
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
คูมาริน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ซาโปนิน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แทนนิน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
โฟลบาแทนนิน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เทอร์ปีนอยด์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สเตียรอยด์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*หมายเหตุ - หมายถึง ทดสอบไม่พบสาร + หมายถึง ทดสอบพบสาร

จากตารางที่ 3 การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลของบัวฉัตรขาวแบบสดและแบบแห้งจะพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 6 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน และเทอร์ปีนอยด์

ผลการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสง ผลแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาว

สารสกัดสด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g crude extract)	สารสกัดแห้ง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g crude extract)
เกสร	798.00	เกสร	697.60
ใบ	689.26	ใบ	589.21
กลีบดอก	795.30	กลีบดอก	690.00
รังไข่	759.89	รังไข่	650.39
ก้านดอก	619.20	ก้านดอก	549.45

จากตารางที่ 4 พบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาวได้แก่ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอกแบบสด มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 798.00 689.26 795.30 759.89 และ 619.20 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ และแบบแห้งของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอก มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 697.60 589.21 690.00 650.39 และ 549.45 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ

ผลการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิตินและค่าการดูดกลืนแสง ผลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาว

สารสกัดสด	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)	สารสกัดแห้ง	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)
เกสร	69.82	เกสร	65.25
ใบ	60.98	ใบ	58.43
กลีบดอก	69.47	กลีบดอก	64.40
รังไข่	65.32	รังไข่	63.78
ก้านดอก	59.34	ก้านดอก	50.59

จากตารางที่ 5 พบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาวได้แก่ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอก แบบสด มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 69.82 60.98 69.47 65.32 และ 59.34 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ และแบบแห้งของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอก แบบแห้ง มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 65.25 58.43 64.40 63.78 และ 50.59มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวโดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH Radical Scavenging

จากการทดลองฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากบัวฉัตรขาวทดสอบโดยเทคนิค DPPH Radical Scavenging และจากการทดสอบการยั้งยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยอาศัยหลักการจับอนุมูลอิสระด้วย DPPH Radical Scavenging เมื่อทำการละลายในเอทานอลจะเห็นเป็นสารละลายสีม่วง เมื่อ DPPH รับอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเรดิคัล จะทำให้มีค่าเสถียรมากขึ้นและเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง

ผู้วิจัยวัดสมบัติการยับยั้ง DPPH Radical Scavenging แล้วนำมาหาค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 31-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาหาค่า EC_{50} ของ BHT BHA และสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาว ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่า EC_{50} ของ BHT BHA และสารสกัดหยาบบัวฉัตรขาวส่วนต่างๆ

สารสกัด	EC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารสกัด	EC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
BHT	2.19	BHA	2.44
เกสรสด	2.03	เกสรแห้ง	1.99
ใบสด	2.89	ใบแห้ง	2.17
กลีบดอกสด	2.11	กลีบดอกแห้ง	2.01
รังไข่สด	2.26	รังไข่แห้ง	2.00
ก้านดอกสด	2.45	ก้านดอกแห้ง	2.34

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC50 ของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอกแบบสด เท่ากับ 2.03 2.89 2.11 2.26 และ 2.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอกแบบแห้ง เท่ากับ 1.99 2.17 2.01 2.00 และ 2.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA ซึ่งมีค่า EC50 เท่ากับ 2.19 และ 2.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในการทดลองทำการสกัดสารจากบัวฉัตรขาว โดยนำส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาวมาแช่ด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดจากบัวฉัตรขาวแบบสดของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอก คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบเท่ากับ 1.30 2.30 1.06 1.93 และ 2.91 ตามลำดับ และการสกัดจากบัวฉัตรขาวแบบแห้งของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอก คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบเท่ากับ 1.09 2.02 1.29 1.14 และ 2.63

ตามลำดับ ซึ่งจากการหาค่าร้อยละของสารสกัดหยาบจะพบว่าสารสกัดหยาบแบบสดของบัวฉัตรขาวจากส่วนต่างๆจะมีร้อยละของสารสกัดหยาบมากกว่าสารสกัดแบบแห้ง

สารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลของบัวฉัตรขาวแบบสดและแบบแห้งที่ทำการทดสอบทั้งหมด 9 ชนิด จะพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 6 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน และเทอร์ปีนอยด์ แต่ไม่พบแอนทราควิโนน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

จากการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆ ของบัวฉัตรขาวได้แก่ ได้แก่ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอก ทั้งแบบสดและแบบแห้ง พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีปริมาณค่อนข้างสูง แต่เมื่อเปรียบเทียบกันก็จะทำให้ทราบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะมากกว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารกลุ่มปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์มีรายงานว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ณพัฐอร บัวฉุน และเยาวนารถ งามนนท์(2561) และในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ซึ่งอนุมูล DPPH เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล อนุมูล DPPH เมื่ออยู่ในสารละลายจะมีสีม่วง และเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ ให้หรือรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูล DPPH จะได้เป็นสาร diphenyl picrylhydrazyl (DPPH:H) ที่ไม่เป็นอนุมูลอีกต่อไป สีที่เกิดขึ้นจึงมีสีเหลืองนวล ซึ่งในการทดลองนี้พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ โดยที่ค่า EC50 ของสารสกัดหยาบของบัวฉัตรขาวของ เกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอกแบบสด เท่ากับ 22.03 2.89 2.11 2.26 และ 2.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเกสร ใบ กลีบดอก รังไข่ และก้านดอกแบบแห้ง เท่ากับ 1.99 2.17 2.01 2.00 และ 2.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA ซึ่งมีค่า EC50 เท่ากับ 2.19 และ 2.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ กันญารัตน์ ภิรมย์มั่น (2550) และ พัชรี คล้ายวัฒนะ (2550) กลไกในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เกิดจากการให้หรือรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล ซึ่งจะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกันเอง ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมลูอิสระหยุดลง และผลจากงานวิจัยจะสอดคล้องกับงานวิจัย มนสิชา ขวัญเอกพันธ์ และคณะ (2555) ได้สารสกัดจากส่วนเถาชะเอมไทย พบว่า สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายร้อยละ 80 เมทานอล และร้อยละ 80 เอทานอล มีร้อยละของสารสกัดคือ 3.23 และ 6.12 และพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมเท่ากับ 10.54 ± 0.03 และ 10.18 ± 0. 02 มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และยังสอดคล้องกับผลการวิจัยของ พิชยา ประเสริฐแสง และวรินทร ชวศิริ (2545) ที่ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลพิลังกาสา พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดผลพิลังกาสา พบสารบริสุทธิ์ 3 ชนิด และพบว่ามี Embelin เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดผลพิลังกาสามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาก และสอดคล้องกับ เกสรี กลิ่นสุคนธ์ และคณะ (มปป.) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพร พื้นบ้านของไทยจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ผักคราดหัวแหวน ผักบุ้งทะเล สมอไทย สมอพิเภก และส้มป่อย พบว่าสารสกัดจากสมอพิเภก และสมอไทย มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟาโวนอยด์สูงที่สุด โดยมีปริมาณสารฟีนอลิกเท่ากับ 216.65 ± 10.55 196.90 ± 6.49 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 38.27 ± 3.21, 33.90 ± 2.37 มิลลิกรัมสมมูลของเคทเทคินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และสารสกัดจากสมอพิเภก สมอไทย มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50} เท่ากับ 0.0029 ± 0.0007

และ 0.0281 ± 0.0032 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และ ABTS (EC_{50} เท่ากับ 0.822 ± 0.104 และ 1.058 ± 0.057 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ได้ดี

เอกสารอ้างอิง

กันญารัตน์ ภิรมย์มั่น. (2550). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากต้นกระทือป่า และว่านริดสีดวง*. สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2542). *ผักพื้นบ้านภาคกลาง*. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

ณพัฐอร บัวฉุน. (2558). สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากชะเอมไทย. *วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. 10*(2), 78-95.

ณพัฐอร บัวฉุน และเยาวนารถ งามนนท์. (2561). การพัฒนาโลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 13 ฉบับที่ 2*, 74-85.

ปฏิมา บุญมาลี และ ปัทมา เทียนวรรณ. (2556). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์ไทโรซิเนสของครีมตรีผลา*. ปริญญาเภสัชศาสตร์ บัณฑิตคณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

พัชรี คล้ายวัฒนะ. (2550). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นขิงแม่โขง*. สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

พิชยา ประเสริฐแสง และ วรินทร ชวศิริ. (2545). *องค์ประกอบทางเคมีของผลพิลังกาสา (Ardisia colorata Roxb.) และฤทธิ์ทางชีวภาพ*. ปริญญานิพนธ์วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. วิทยาศาสตร์ (เคมี). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มนสิชา ขวัญเอกพันธ์ และคณะ. (2555). *ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากส่วนเถาชะเอมไทย*. เชียงราย : มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

สุธาทิพย์ อินทรกำธรชัย และคณะ. (2555) *การพัฒนาครีมชะลอวัยผสมสารสกัดดอกมะลิลา*. เชียงราย: มหาวิทยาลัย แม่ฟ้าหลวง.

Leite, L., &Dourado, L. (2013). Laboratory activities, science education and problem-solving skills. *Procedia-Social and Behavioral Sciences. 106*, 1677-1686.

Lingkard, K., Singlaton, V.L.(1977). Totalphenal analysis Automation and comparison with manual method. *Am J EnolVitic. 28*, 49-55.