

พฤษภเคมี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้

ณพัชร บัวฉุน^{1*}

Received : September 5, 2023

Revised : February 17, 2024

Accepted : May 8, 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤษภทางเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้ โดยดอกกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลองเป็นดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด ได้แก่ เอื้องแวมยุรา เอื้องสายหลวง เอื้องครึ่ง และเอื้องเหลืองจันทร์บุรุษ และกล้วยไม้สกุลม็อคคารา 4 ชนิด ได้แก่ จิตติ หมูทอง นอราบลู และประกายเพชร โดยนำกลีบดอกกล้วยไม้มาทำการสกัดด้วยเอทานอล จากการศึกษา พบว่า สารสกัดหยาบกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลม็อคคาราพบสารพฤษภเคมี 6 ชนิดที่เหมือนกัน ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน ทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เมื่อทำการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายชนิดแวมยุรา และสกุลม็อคคาราชนิดนอราบลูมีปริมาณมากที่สุด (208.58 ± 1.00 mg GAE/g, 219.65 ± 1.83 mg QE/g และ 198.23 ± 1.56 mg GAE/g, 203.67 ± 1.02 mg QE/g) และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และวิธี ABTS assay พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องแวมยุรา และกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดหมูทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (EC_{50} 15.34 ± 1.30 mg/ml, EC_{50} 7.33 ± 1.02 mg/ml และ EC_{50} 11.90 ± 1.27 mg/ml, EC_{50} 8.43 ± 1.45 mg/ml) และพบว่า กล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องแวมยุรา และกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดหมูทองมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (EC_{50} 15.09 ± 1.92 mg/ml และ EC_{50} 12.44 ± 1.29 mg/ml) จากผลการทดลองสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีคุณสมบัติฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในอนาคต และใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชประเภทกล้วยไม้ต่อไป

คำสำคัญ: กล้วยไม้ พฤษภเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

¹ อาจารย์ประจำสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
จังหวัดปทุมธานี อีเมล: napattaom@vru.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: napattaom@vru.ac.th

PHYTOCHEMICALS, TOTAL PHENOLIC CONTENT, TOTAL FLAVONOID CONTENT,
ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND TYROSINASE INHIBITION ACTIVITY
FROM CRUDE EXTRACTS OF ORCHIDS

Napattaorn Buachoon¹

Abstract

This research aimed to investigate the phytochemical screening, total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, and tyrosinase inhibition activity of crude orchid flower extracts. The orchids used in the experiments included four species of the *Dendrobium* genus: Waew Mayura (*Dendrobium fimbriatum* Hook), Sai Luang (*Dendrobium anosmum* Lindl), Klang (*Dendrobium parishii* Rchb.f.), Lueng Chantaboon (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.); and four species of the *Mokara* genus: Mokara Jitti, Mokara Mu Thong, Mokara Nora Blue, and Mokara Prakai Phet. The petals of these orchids were extracted with ethanol. The study results found that the crude extracts from both the *Dendrobium* and *Mokara* genera contain six similar types of phytochemicals: flavonoids, coumarins, tannins, terpenoids, steroids, and cardiac glycosides. Upon examining the total phenolic and flavonoid content, it was found that the Waew Mayura (*Dendrobium fimbriatum* Hook) and Mokara Nora Blue orchids had the highest concentrations (208.58 ± 1.00 mg GAE/g, 219.65 ± 1.83 mg QE/g, and 198.23 ± 1.56 mg GAE/g, 203.67 ± 1.02 mg QE/g, respectively). Antioxidant activities were tested using the DPPH and ABTS assays, revealing that Waew Mayura (*Dendrobium fimbriatum* Hook) and Mokara Mu Thong exhibited the highest antioxidant activities (EC_{50} 15.34 ± 1.30 mg/ml, EC_{50} 7.33 ± 1.02 mg/ml, and EC_{50} 11.90 ± 1.27 mg/ml, EC_{50} 8.43 ± 1.45 mg/ml, respectively). Additionally, Waew Mayura (*Dendrobium fimbriatum* Hook) and Mokara Mu Thong demonstrated the most potent tyrosinase inhibitory effects (EC_{50} 15.09 ± 1.92 mg/ml and EC_{50} 12.44 ± 1.29 mg/ml, respectively). These findings provide a fundamental basis for the development of cosmetic products with antioxidant and tyrosinase inhibitory properties in the future, as well as for further studies on the bioactive compounds of orchids.

Keywords: Orchid, Phytochemical, Antioxidant activity, Tyrosinase inhibition activity

¹ Lecturer of Chemistry and Science Program, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage Pathum Thani Province, e-mail: napattaorn@vru.ac.th

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

บทนำ

กล้วยไม้(orchid) เป็นพืชดอกที่นิยมปลูกเพื่อการค้า สามารถจำหน่ายได้ทั้งในรูปแบบไม้กระถาง หรือ การตัดดอก มีความสวยงามโดดเด่น นอกจากนี้ยังมีการนำมาทำให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น ด้วยการนำส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้มาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรมากขึ้น เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น สารกลุ่ม Alkaloids, Sesquiterpens, Phenanthrens, Flavonoids, Carotenoid และ Phytosterols เป็นต้น (Hossain, 2011) ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวายเป็นสกุลที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรมาก เนื่องจากมีสารที่มีหมู่ Phenol ในโครงสร้างได้แก่ สารกลุ่ม Bibenzyl, Phenanthrene และ Fluorenone (Yang et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาของสารกลุ่ม Bibenzyl พบว่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการเจริญของเนื้องอกหรือมะเร็ง (Antitumor) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เป็นต้น (Liu et al., 2010; Tsai et al., 2010; Luo et al., 2011) และจากการศึกษา พบว่า กล้วยไม้หวายม่วงแดง มีสารประกอบฟีนอลิก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกับวิตามินซีซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (Shafazila et al., 2010)

ในปัจจุบันมีการนำเอาสารสกัดจากกล้วยไม้มาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติมีความปลอดภัย ไม่เป็นอันตราย สามารถทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารออกฤทธิ์ที่มีในธรรมชาติที่มีศักยภาพในการลดริ้วรอย ลดการเกิดผิวหมองคล้ำ และช่วยในเรื่องของการชะลอวัยพบว่าเป็นสารประเภทกลุ่มฟีนอลิก เช่น สารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารประเภทนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2544) ส่งผลให้เซลล์ต่างๆ จะเสื่อมลงเรื่อย ๆ ทำให้ร่างกายเสื่อมสภาพลงและอาจก่อให้เกิดการทำลายเซลล์รวมถึงการกลายพันธุ์ (Mutation) ของเซลล์ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ และสารสำคัญที่มีอยู่ในกล้วยไม้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส (ธริชตรี เทพจันทร์ และคณะ 2561) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล ภายในโครงสร้างของเอนไซม์จะประกอบไปด้วยทองแดง (Cu) ซึ่งมีหน้าที่ทำงานร่วมกับออกซิเจนเพื่อเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้นสามารถพบเอนไซม์ได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis synthesis) ซึ่งกระบวนการนี้จะทำให้ผลไม้และพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือผิวหน้ามีสีหมองคล้ำลง (สมชาติ แม่นปิ่น, 2559)

จากการค้นคว้าและรวบรวมงานวิจัยพบว่ามีผู้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลหวาย ได้แก่ เอื้องแวมยุรา เอื้องสายหลวง เอื้องครั่ง และเอื้องเหลืองจันทร์ กล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า ได้แก่ ม็อคคาร่า จิตติ ม็อคคาร่าหมทอง ม็อคคาร่านอรابطู และม็อคคาร่าประกายเพชร ซึ่งกล้วยไม้บางชนิดยังมีการศึกษาไม่มาก ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสารฟลักเคมี และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบ ดอกกล้วยไม้จำนวน 8 ชนิด ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ที่มีคุณสมบัติต้านการเกิดอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในอนาคต และใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชประเภทกล้วยไม้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้
2. เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมกลีบดอกกล้วยไม้

ดอกกล้วยไม้ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ กล้วยไม้สกุลหวาย ได้แก่ เอื้องแววมยุรา (สีเหลือง) เอื้องสายหลวง (สีขาวปนม่วง) เอื้องครั่ง (สีชมพูอมม่วง) และเอื้องเหลืองจันทร์ (สีเหลือง) กล้วยไม้สกุลมอศคารา ได้แก่ จิตติ (สีเหลือง) หมูทอง (สีส้ม) นอราบลู (สีม่วงอ่อน) และประกายเพชร (สีชมพูเข้ม) นำมาจากสวนกล้วยไม้ ในช่วงเดือนมีนาคม 2565 จากฟาร์มกล้วยไม้ จังหวัดนครปฐม โดยนำดอกกล้วยไม้แต่ละชนิดมาเด็ดเฉพาะกลีบดอกล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้งให้เป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อดอกกล้วยไม้แห้ง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด นำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งน้ำหนัก

การสกัดกลีบดอกกล้วยไม้

นำผงของกลีบดอกกล้วยไม้ชนิดละ 500 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการหมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการกรองเก็บสารละลาย นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนสุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบกลีบดอกกล้วยไม้แต่ละชนิด

การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ (%w/w) = (น้ำหนักสารสกัดหยาบ x 100) / น้ำหนักแห้ง

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

ทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีในสารสกัดหยาบกลีบดอกกล้วยไม้ เพื่อหาสารสำคัญ 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โพลีฟีนอล เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิโอไกลโคไซด์ โดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ซึ่งดัดแปลงจาก วิธีการของ Koleva et al. (2002) และ Ayoola et al. (2008) แต่ละการทดสอบทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ดังนี้

การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายด้วย 50% ethanol ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองนำสารละลายมาใส่หลอดแมกนีเซียม หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 หยด เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 3 นาที สารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงว่า พบฟลาโวนอยด์

การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinones) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำละลาย 10% H₂SO₄ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 3 นาที กรอง นำสารละลายที่ได้เติมน้ำละลาย 10% NH₃ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า สารละลายเป็นสีชมพูแดง แสดงว่า พบแอนทราควิโนน

การตรวจสอบคูมาริน (Coumarins) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมละลายด้วย 50 % ethanol ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรอง นำสารละลายที่ได้เติมสารละลาย 6M NaOH ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า สารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงว่า พบคูมาริน

การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่า พบฟองถาวร แสดงว่า พบซาโปนิน

การตรวจสอบแทนนิน (Tannins) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรอง นำสารละลายที่ได้เติมสารละลาย 1% FeCl_3 3 หยด เขย่า สารละลายสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำ แสดงว่า พบแทนนิน

การตรวจสอบโพลบาแทนนิน (Phlobatannins) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรอง นำสารละลายที่ได้เติมสารละลาย 10% HCl ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที สารละลายเป็นสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำ แสดงว่า พบโพลบาแทนนิน

การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองนำสารละลายที่ได้ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด พบวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่า พบเทอร์ปีนอยด์

การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroids) ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองนำสารละลายที่ได้ เติมกรดแกลเซียลแอซิดิก 3 หยด เขย่า เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด สารละลายเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่า พบสเตียรอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีจาก Tsai et al., 2005)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย 7% Na_2CO_3 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 สำหรับ blank ใช้ น้ำกลั่นหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัม น้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน ที่ความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 1% AlCl_3 ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 สำหรับ Blank ใช้ น้ำกลั่น และทำการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน ในหน่วย

มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน BHA (Butylated hydroxyanisole), BHT (Butylated hydroxytoluene) และแอลฟา-โทโคฟีรอล (α -tocopherol) และสารสกัดหยาบตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้น 50, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดแต่ละความเข้มข้นที่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 6×10^{-5} โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา % Radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

โดย Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Effective concentration (EC_{50}) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % Radical scavenging

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect (ดัดแปลงวิธีจาก Phansawan, 2013)

เตรียมสารละลาย ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลาย ABTS และสารละลาย Potassium persulfate เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS radical หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วย 99% เอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนคลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่นที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 และทำการเตรียมสารละลายสารมาตรฐาน BHT, BHA และ α -tocopherol เหมือนสารตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยเปรียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ BHT, BHA และแอลฟา-โทโคฟีรอล

การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ดัดแปลงวิธี จาก Long et al., 2002)

เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ที่ความเข้มข้น 50, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเอทานอล นำสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ Dopachrome method เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ทำการเติมสารละลาย Control (Sodium phosphate buffer 0.02 โมลาร์ (pH 6.8)

1500 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 1,000 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ 99% ethanol 500 ไมโครลิตร) และสารละลายตัวอย่าง (Sodium Phosphate Buffer 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) 1500 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 500 ไมโครลิตร) ลงในถาดหลุม (Cell culture plate) ของเครื่อง Microplate Reader รุ่น EnSpire 2300N เขย่าให้สารละลายผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA (Butylated hydroxyanisole) 500 μ L ลงในจานหลุม ปรับปริมาตรด้วย 99% ethanol เขย่าให้สารละลายผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร อีกครั้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase Inhibition) ดังสมการ

$$\% \text{ Tyrosinase Inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดกับ % Tyrosinase Inhibition เพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (EC₅₀)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple-range tests ที่ระดับ P < 0.05

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการสกัดสารจากกล้วยไม้

เมื่อนำดอกกล้วยไม้แต่ละชนิด มาอบแห้ง สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % เป็นเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีส่วนสกัดหยาบที่มีลักษณะข้นเหนียว และมีน้ำหนักสารสกัดหยาบและร้อยละสารสกัดหยาบ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักและร้อยละของสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้

ชนิดดอกกล้วยไม้	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละสารสกัดหยาบ
กล้วยไม้สกุลหวาย		
เอื้องสายหลวง	15.26	3.05
เอื้องแววมยุรา	14.32	2.86
เอื้องครั่ง	13.52	2.70
เอื้องเหลืองจินตपुर	13.45	2.69
กล้วยไม้สกุลม็อคคารา		
จิตติ	13.90	2.78
หมูทอง	12.21	2.44
นอราบลู	15.35	3.07
ประกายเพชร	14.08	2.82

จากตารางที่ 1 เมื่อนำดอกกล้วยไม้แต่ละชนิดไปทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องสายหลวงมีน้ำหนักสารสกัดหยาดสูงที่สุด (15.26 กรัม) คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาดเท่ากับ 3.05 รองลงมาคือ สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดเอื้องแวมยุรา (14.32 กรัม) คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาดเท่ากับ 2.86

สำหรับกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดนอราบลูมีน้ำหนักสารสกัดหยาดสูงที่สุด (15.35 กรัม) คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาดเท่ากับ 3.07 รองลงมาคือ สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดประกายเพชร (14.08 กรัม) คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาดเท่ากับ 2.82

ผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

เมื่อนำสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และดอกกล้วยไม้สกุลม็อคคารามาตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลม็อคคารา

สารสกัดหยาด ดอกกล้วยไม้	ฟลาโวนอยด์	แอนทราควิโนน	คูมาริน	ซาโปนิน	แทนนิน	โพลีเอแทนนิน	เทอร์ปีนอยด์	สเตียรอยด์	คาร์ดิแอกไกลโคไซด์
สกุลหวาย									
เอื้องสายหลวง	+	-	+	-	+	-	+	+	+
แวมยุรา	+	-	+	-	+	-	+	+	+
เอื้องครึ่ง	+	-	+	-	+	-	+	+	+
เหลืองจันทร์บุร	+	-	+	-	+	-	+	+	+
สกุลม็อคคารา									
จิตติ	+	-	+	-	+	-	+	+	+
หมู่ทอง	+	-	+	-	+	-	+	+	+
นอราบลู	+	-	+	-	+	-	+	+	+
ประกายเพชร	+	-	+	-	+	-	+	+	+

หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ + หมายถึง ตรวจสอบพบ

จากตารางที่ 2 แสดงการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด และสกุลม็อคคารา 4 ชนิด โดยพบสารพิษเคมี 6 ชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดเอื้องแวมยุราปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (208.58 ± 1.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) รองลงมา คือ สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดเอื้องเหลืองจันทร์บุร (197.36 ± 1.98

มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) เอื้องครั้ง (197.36 ± 1.98 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) และเอื้องสายหลวง (156.89 ± 1.23 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) ตามลำดับ สำหรับกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดนอราบลูมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (198.23 ± 1.56 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) รองลงมา คือ หมูทอง (14.08 มิลลิกรัมสมมูลของ กรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) ประกายเพชร (156.25 ± 1.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) และจิตติ (132.32 ± 1.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 3

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องแวมยุราปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (219.65 ± 1.83 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) รองลงมา คือ เอื้องเหลืองจินฑูร (201.23 ± 1.21 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) เอื้องครั้ง (188.21 ± 1.02 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) และเอื้องสายหลวง (166.36 ± 1.53 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) ตามลำดับ และในกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดนอราบลูมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด (203.67 ± 1.02 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) รองลงมา คือ หมูทอง (187.39 ± 1.21 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) ประกายเพชร (167.24 ± 1.12 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) และจิตติ (141.25 ± 1.76 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลม็อคคารา

สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g)
สกุลหวาย		
เอื้องสายหลวง	156.89 ± 1.23^a	166.36 ± 1.53^a
เอื้องแวมยุรา	208.58 ± 1.00^a	219.65 ± 1.83^a
เอื้องครั้ง	176.45 ± 1.03^a	188.21 ± 1.02^a
เอื้องเหลืองจินฑูร	197.36 ± 1.98^a	201.23 ± 1.21^a
สกุลม็อคคารา		
จิตติ	132.32 ± 1.00^a	141.25 ± 1.76^a
หมูทอง	171.49 ± 1.35^a	187.39 ± 1.21^a
นอราบลู	198.23 ± 1.56^a	203.67 ± 1.02^a
ประกายเพชร	156.25 ± 1.01^a	167.24 ± 1.12^a

หมายเหตุ ^a แสดงถึงไม่มีความแตกต่างของชุดข้อมูลในแต่ละคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากตารางที่ 3 เมื่อทำการทดสอบเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กับ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g) จากสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้ในแต่ละสกุลพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ในการทดลองจะทำการสกัดด้วยเอทานอล ทำให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณสูง เนื่องจาก สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีความเป็นขี้ผึ้ง จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขี้ผึ้งใกล้เคียงกัน ซึ่งส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขี้ผึ้งสูงในตัวทำละลายจำพวก แอลกอฮอล์ได้ดี ทำให้สารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายได้ดีในเอทานอล (Zhou et al., 2016)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้ สกุนทรวาย และสกุลม็อคคารา พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุนทรวาย และสกุลม็อคคาราแต่ละชนิดมีความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญทั้งนี้อาจเนื่องจากเป็นดอกกล้วยไม้ต่างสายพันธุ์กันแม้ว่าจะอยู่ในสกุลหวายและสกุลม็อคคาราเหมือนกันก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jullapo (2016) ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.15-5.34 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.12-4.01 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน/กรัมน้ำหนักสารสกัดแห้งในกล้วยไม้สกุนทรวายชนิดอื่นๆ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay และ ABST assay ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABST เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยอนุมูล DPPH และ ABST เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับ ABST โดยเป็นการวัดความสามารถของสารที่ต้องการจะทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่นิยมใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไป ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABST เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกไซด์ เนื่องจาก ABST เป็นอนุมูลอิสระที่สลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกไซด์ ซึ่งการทดสอบทั้งสองวิธีนี้สามารถทำปฏิกิริยาในตัวกลางที่เป็นสารอินทรีย์ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยนี้รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลง 50 % (EC_{50}) โดยค่าที่น้อยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH จากสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้ พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุนทรวาย โดยพบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุนทรวาย ชนิดเอื้องแวมยุรา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay สูงที่สุด (EC_{50} 15.34 $\pm$ 1.30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา คือ สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุนทรวาย ชนิดเอื้องเหลืองจันทร์บุร (EC_{50} 18.20 $\pm$ 1.91 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เอื้องครั้ง (EC_{50} 20.12 $\pm$ 1.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเอื้องสายหลวง (EC_{50} 23.63 $\pm$ 1.68 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ และในกล้วยไม้สกุลม็อคคารา พบว่า ชนิดหมูทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH สูงที่สุด (EC_{50} 11.90 $\pm$ 1.27 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา คือ นอราบลู (EC_{50} 13.11 $\pm$ 1.90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ประกายเพชร (EC_{50} 15.35 $\pm$ 1.07 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และจิตติ (EC_{50} 17.33 $\pm$ 1.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ผลจากการทดลอง พบว่า สารสกัดจากดอกกล้วยไม้สกุนทรวาย และสกุลม็อคคารา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ได้มากกว่า สารมาตรฐาน BHA, BHT และ α -tocopherol ดังตารางที่ 4 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นวิธีการตรวจวัดอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว (Phunsawan, 2013) โดยวิธีการตรวจวัดดังกล่าวรายงานค่าเป็น EC_{50} ที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 50 และจากผลการทดลองจะ พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดแวมยูราามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด สำหรับกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดหนูทอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เนื่องจากเอื้องแวมยูรา หนูทอง มีสีเหลือง และมีสีที่มีความเข้มกว่า เอื้องเหลือง จันทบูร จิตติ เอื้องครั่ง เอื้องสายหลวง นอราบลู และประกายเพชร โดยสารสีหรือรงควัตถุ (Pigment) มีสีเหลือง ส้ม และส้มแดง ที่พบในพืชและดอกไม้ เป็นสารกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Nguyen et al., 2018; Siriwattanamethanon, 2020; Prapalert et al., 2018)

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS จากสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้ พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย โดยพบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดเอื้องแวมยูราามีฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS สูงที่สุด (EC_{50} 7.33 ± 1.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา คือ สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดเอื้องเหลืองจันทบูร (EC_{50} 9.32 ± 1.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เอื้องครั่ง (EC_{50} 10.43 ± 1.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเอื้องสายหลวง (EC_{50} 12.74 ± 1.34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ในกล้วยไม้สกุลม็อคคาราชนิดหนูทอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS สูงที่สุด (EC_{50} 8.43 ± 1.45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา คือ นอราบลู (EC_{50} 9.19 ± 1.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ชนิดประกายเพชร (EC_{50} 10.07 ± 1.56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และจิตติ (EC_{50} 12.44 ± 1.29 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ผลจากการทดลอง พบว่า สารสกัดจากดอกกล้วยไม้สกุลสกุลหวายทั้งและมีม็อคคารามีฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS ได้มากกว่า สารมาตรฐาน BHA, BHT และ α -tocopherol ข้อมูลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลม็อคคารา

สารสกัดหยาด ดอกกล้วยไม้	ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	
	DPPH assay EC_{50} (mg/ml)	ABTS assay EC_{50} (mg/ml)
สกุลหวาย		
เอื้องสายหลวง	23.63 ± 1.68^a	12.74 ± 1.34^b
แวมยูรา	15.34 ± 1.30^a	7.33 ± 1.02^b
เอื้องครั่ง	20.12 ± 1.12^a	10.43 ± 1.04^b
เหลืองจันทบูร	18.20 ± 1.91^a	9.32 ± 1.11^b
สกุลม็อคคารา		
จิตติ	17.33 ± 1.11^a	12.44 ± 1.29^b
หนูทอง	11.90 ± 1.27^a	8.43 ± 1.45^b
นอราบลู	13.11 ± 1.90^a	9.19 ± 1.06^b
ประกายเพชร	15.35 ± 1.07^a	10.07 ± 1.56^b
BHT	19.50 ± 1.37^a	11.22 ± 1.38^b
BHA	18.34 ± 1.89^a	10.02 ± 1.45^b
α -tocopherol	17.08 ± 1.09^a	9.23 ± 1.11^b

หมายเหตุ ^{a,b} แสดงถึงความแตกต่างของชุดข้อมูลในแต่ละคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ค่าเฉลี่ยของ DPPH assay EC_{50} กับ ABTS assay EC_{50} จากสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้ในแต่ละสกุลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การตรวจสอบคุณสมบัติฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS จากการทดลอง พบว่า สารสกัดจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และกล้วยไม้สกุลมอศคาราทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS ได้แตกต่างกัน และพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS มีความสอดคล้องกับผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากกล้วยไม้มีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ สารประกอบอัลคาลอยด์ และสารประกอบอื่นๆ (Amic et al., 2003) ซึ่งสารแต่ละชนิดมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้ พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดเอื้องแวมยุรา มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (EC_{50} 15.09 ± 1.92 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา คือ เอื้องเหลืองจันทร์บูร (EC_{50} 16.39 ± 1.76 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เอื้องครั้ง (EC_{50} 19.45 ± 1.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และเอื้องสายหลวง (EC_{50} 23.82 ± 1.43 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ และในกล้วยไม้สกุลมอศคาราชนิดหนูทอง มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (EC_{50} 12.44 ± 1.29 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา คือ ประกายเพชร (EC_{50} 21.23 ± 1.67 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นอราบลู (EC_{50} 25.46 ± 1.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และจิตติ (EC_{50} 27.91 ± 1.23 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ผลจากการทดลอง พบว่า สารสกัดจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลมอศคาราทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แต่น้อยกว่าสารมาตรฐาน Kojic acid ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลมอศคารา

สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้	Tyrosinase Inhibitory activity (EC_{50} mg/ml)
สกุลหวาย	
เอื้องสายหลวง	23.82 ± 1.43
เอื้องแวมยุรา	15.09 ± 1.92
เอื้องครั้ง	19.45 ± 1.05
เอื้องเหลืองจันทร์บูร	16.39 ± 1.76
สกุลมอศคารา	
จิตติ	27.91 ± 1.23
หนูทอง	18.48 ± 1.04
นอราบลู	25.46 ± 1.78
ประกายเพชร	21.23 ± 1.67
Kojic acid	0.39 ± 1.23

ทั้งนี้เมื่อนำฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลมอศคารามาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีกว่าสารสกัดหยาดดอกกล้วยไม้สกุลมอศคารา การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น ซึ่งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น L-Dopaquinone ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็น Dopachrome ด้วยกระบวนการออกซิเดชัน เกิดเป็นสารละลายสีส้มแดง มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร จากการทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลมออคคารามีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้ สารประกอบฟีนอลิกมีสภาพชั่วคราวสูง มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยจะเปลี่ยนสาร Tyrosine ไปเป็นสาร DOPA และ DOPA quinone จนกระทั่งกลายเป็นเม็ดสีดำของ Eumelanin (พิมพ์ ลิลาพรพิสิฐ, 2544) การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลมออคคาราอาจมาจากสารในกลุ่มไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเกิดพันธะไฮโดรเจนกับบริเวณเร่ง หรือบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์มีประสิทธิภาพการทำงานลดลง โดยเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (Madhan et al., 2007) และยังพบว่า สารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีสมบัติในการเป็นตัวจับ (Chelators) ที่สามารถจับกับไอออน Zn^{2+} บริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ (Malešev & Kuntić, 2007) ทั้งนี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจจะเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสมบัตินี้เหมาะแก่การนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวเพื่อลดจุดด่างดำ และช่วยให้ผิวมีความกระจ่างใส โดยต้องผ่านกระบวนการแยกเอาสารออกฤทธิ์มาใช้

สรุป

ผลการทดลองในครั้งนี้ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้ สกุลหวาย และสกุลมออคคาราที่สกัดด้วยเอทานอล 95% พบว่าสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลมออคคารามีสารพฤกษเคมี 6 ชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน ทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ สารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้สกุลหวายชนิดแวมยุรา กล้วยไม้สกุลมออคคาราชนิดนอร่าลูมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด สำหรับประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ชนิดเอื้องแวมยุรา และกล้วยไม้สกุลมออคคาราชนิดหนูทอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay และสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้สกุลหวายจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดหยาบดอกกล้วยไม้สกุลมออคคารา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลมออคคารามีคุณสมบัติฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สามารถนำไปต่อยอดประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับกล้วยไม้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยต่อไปควรแยกองค์ประกอบเพื่อหาโครงสร้างทางเคมี และทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการพัฒนาพืชสมุนไพรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ธริษตรี เทพจันทร์, นกักร ยะคะเรศ, และเปรมกมล นิธิชนกุล. (2561). การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่. ชลบุรี: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. (2544). เครื่องสำอางสำหรับผิวแห้ง. (พิมพ์ครั้งที่ 2). เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- สมชาติ แม่นปิ่น. (2559). การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารบริสุทธิ์จากน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอม (รายงานการวิจัย). มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อัญญา เจนวิถีสุข. (2544) การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย. เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Amic, D., Davidovic-Amic D., Beslo D., & Trinajstic. N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatia Chemical Acta**, 76(1), 55–61.
- Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., & Atangbayila, T.O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 7(3), 1019–1024.
- Hossain, M.M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances-an overview. **Fitoterapia**, 82(2), 102-140.
- Jullapo, N. (2016). **Phytochemical screening and biological activities of Dendrobium spp.** Master's Thesis. Burapha University.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P., de Groot, A., & Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, 13(1), 8-17.
- Long, Z.P., Park, H.R., Park, Y.K., Lee, S.K., Park, J.H., & Park, M.K. (2002). Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 50(3), 309-311.
- Liu, Y.N., Pan, S.L., Peng, C.Y., Huang, D.Y., Guh, J.H., Chen, C.C., Shen, C.C., & Teng, C.M. (2010). Moscatilin repressed lipopolysaccharide-induced HIF-1 α accumulation and NF- κ B activation in murine RAW264.7 cells. **Shock**, 33(1), 70-75.
- Luo, A.X., Ge, Z., Fan, Y.J., Luo, A.S., Chun, Z., & He, X.J. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium denneanum*. **Molecules**, 16, 1579-1592.
- Madhan, B., Krishnamoorthy, G., Rao, J. R., & Nair, B. U. (2007). Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. **International Journal of Biological Macromolecules**, 41(1), 16-22.
- Malešev, D., & Kuntić, V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 72(10), 921-939.

- Nguyen, H.A., Lin, K.H., Huang, M.Y., Yang, C.M., Shin, T.H., Hsiung, T.C., Lin, Y. C., & Tsao, F.C. (2018). Antioxidant activities of the methanol extracts of various parts of *Phalaenopsis* Orchids with white, yellow, and purple flowers. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, 46(2), 457-465.
- Phansawan, B. (2013). Free radicals, Antioxidants and antioxidant activity determination. **Journal of Science and Technology**, 21(3), 275–286.
- Prapalert, W., Phottraithip, W., & Chotikadachanarong, K. (2019). **Study of the activity of phytochemicals in wild orchids. and propagation guidelines for communities.** Retrieved from <http://www.research.cmru.ac.th/research59/ris/view.php?no=904>.
- Prommuak, C., De-Eknamkul, W., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extract. **Separation and Purification Technology**, 62(2), 444-448.
- Shafazila, T.S., Lee, P.M., & Hung, L.K. (2010). **Radical scavenging activities of extract and solvent-solvent partition fractions from Dendrobium Sonia ‘Red Bom’ flower.** pp. 762-765. In International Conference on Science and Social Research 2010. Malaysia.
- Siriwattanamethanon, N. (2020). **Multi-coloured food There are many benefits (Part 1): What are multicolored foods.** Retrieved from <https://pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0148.pdf>.
- Tsai, C.C., Chen, H.S., Chen, S.L., Ho, Y.P., Ho, K.Y., & Wu, Y.M. (2005). Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. **Journal Periodontal Research**, 40(5), 378–384.
- Tsai, A.C., Pan, S.L., Liao, C.H., Guh, J.H., Wang, S.W., Sun, H.L., Liu, Y.N., Chen, C.C., Shen, C.C., Chang, Y.L., & Teng, C.M. (2010). Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, 292(2), 163-170.
- Yang, L., Wang, Z., & Xu, L. (2006). Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene, and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography A**, 1104, (1-2), 230-237.
- Zhou, X.M., Zheng, C.J., Gan, L.S., Chen, G.Y., Zhang, X.P., Song, X.P., Li, G.N., & Sun, C.G. (2016). Bioactive Phenanthrene and Bibenzyl Derivatives from the Stems of *Dendrobium nobile*. **Journal of Natural Products**, 79, 1791-1797.