

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

E.3 S.A. 2552

โครงการ “การหาปริมาณ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ในสารสกัดจากดอกไม้และฤทธิ์ในการเป็น free radical scavenging”

โดย สุวรรณา วรรัตน์ และคณะ
กุมภาพันธ์ 2551

S 363126

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การหาปริมาณ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ในสารสกัดจากดอกไม้และฤทธิ์ในการเป็น free radical scavenging”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------|--|
| 1. รศ.ดร.สุวรรณา วรรัตน์ | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (องครักษ์) |
| 2. ผศ. ดร. วีระศักดิ์ สามี | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (องครักษ์) |
| 3. อ. ชญานิศ ศรีชัยวัชวงศ์ | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (องครักษ์) |

สนับสนุนโดย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประเภททุนยุทธศาสตร์ ประจำปี 2550

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประเภททุนยุทธศาสตร์ ประจำปี 2550 ในการสนับสนุนงบประมาณ

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการสนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ รวมถึงกลุ่มนักศึกษาช่วยงาน ที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี



สรุปโครงการ (Executive Summary)

การหาปริมาณ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ในสารสกัดจากดอกไม้ และฤทธิ์

ในการเป็น free radical scavenging

(Quantification of gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin and quercetin from the ethanolic extract of flowers and their effects on free radical scavenging activity)

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. สุวรรณ วรรัตน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อ.องครักษ์ จ.นครนายก

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประเภททุนยุทธศาสตร์ ประจำปี 2550

งบประมาณทั้งโครงการ

252,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินงาน

12 เดือน

ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

นักวิจัยพบว่าปฏิกิริยา Oxidation เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คนเราแก่ก่อนวัยสูญเสียความจำ มีความผิดปกติของสายตา ระบบภูมิคุ้มกันต่ำ และกระดูกไม่แข็งแรง ร่างกายเราใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญอาหารเพื่อให้เกิดพลังงาน ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า Oxidation พบว่าการส่งผ่านประจุไฟฟ้า หรือ electron ของปฏิกิริยา Oxidation ก่อให้เกิดพลังงานและอนุมูลอิสระ(Free radical)

อนุมูลอิสระคือโมเลกุลที่มี electron ขาดหายไป 1 ตัว เมื่อ electron หายไป 1 ตัว ก็จะไม่คงสภาพ สารในโลกนี้จะยอมให้ขาดสมดุลทางไฟฟ้าไม่ได้ ดังนั้น อนุมูลอิสระจะดึงเอา electron จากโมเลกุลข้างเคียงมาเข้าคู่กับตัว เพื่อทำให้เกิดความเสถียรหรือคงสภาพเซลล์ หรือโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระแย่ง electron ไปก็จะขาด electron และกลายเป็นอนุมูลอิสระเสียเอง จึงไปแย่งเอา electron จากสิ่งที่อยู่ข้างเคียงมาเข้าคู่กับตัวเองเช่นกัน ก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

ความเสียหายของส่วนต่างๆ ของร่างกาย หรือความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ เกิดมากยิ่งขึ้น เมื่อเรามีอายุมากขึ้น แต่เราก็มีผักและผลไม้จำนวนมากที่มีคุณสมบัติเป็น Antioxidant สารที่เป็น

Antioxidant ได้แก่ วิตามิน C, E และเบต้า-แคโรทีน ธาตุต่างๆ เช่น ซีลีเนียม แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี โพลีโคมิกอล หรือโพลีนิวเทรียนต่างๆ เช่น แคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็น กลุ่มสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นทำให้เกิดสีน้ำตาลของผัก ดอกไม้ และผลไม้ เช่น สีเหลือง แดง น้ำเงิน เกิดจากสารในกลุ่มนี้ สารฟลาโวนอยด์หรือในบางครั้งเรียกลักษณะฟีนอลิกมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการชะลอความแก่ จึงได้มีการวิจัยอย่างกว้างขวางเพื่อที่จะหาสารที่มีฤทธิ์เหล่านี้โดยเฉพาะสารจากธรรมชาติซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรที่อุดมสมบูรณ์ และมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อย เช่น สารจากส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ใบ ผล และเปลือกต้น เป็นต้น แต่มีงานวิจัยไม่มากนักที่ให้ความสนใจศึกษาสารที่มีฤทธิ์จากดอกไม้ ดังนั้นในโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกดอกไม้มาทำการสกัดสารสำคัญและนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านฤทธิ์ดังกล่าว

วัตถุประสงค์

1 ทราบแหล่งสารฟีนอลิกที่จะพบได้มากในดอกไม้ชนิดใด

2 พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือ

3 ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกไม้แต่ละชนิด

ระเบียบวิธีวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1 การเตรียมสารสกัด

2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการตรวจวัดเชิงปริมาณ

3 การหาปริมาณ Total phenolic compounds

4 การพัฒนามาตรวิธีวิเคราะห์ HPLC และการตรวจสอบความเชื่อมั่นและความถูกต้องของวิธี

5 หาปริมาณสารโดยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้

ผลการวิจัยโดยสรุป

ดอกไม้ 22 ชนิดถูกนำมาสกัดด้วย ethanol แล้วนำสารสกัดแห้งที่ได้จากการระเหยเอาตัวทำละลายออกมาทดสอบฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay และตรวจหาปริมาณสารสำคัญ 5 ตัวที่เป็นสารฟีนอลิก อันได้แก่ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ด้วยวิธี HPLC

ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดจากดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดใน (IC₅₀ = 0.09 mg/ml) รองลงมาได้แก่ สารสกัดจากดอกกุหลาบมอญ (IC₅₀ = 0.10

mg/ml) พวงชมพู ($IC_{50} = 0.15$ mg/ml) จำปา ($IC_{50} = 0.23$ mg/ml) ดาวกระจาย ($IC_{50} = 0.28$ mg/ml) บัวหลวง ($IC_{50} = 0.30$ mg/ml) เข็มแดง ($IC_{50} = 0.31$ mg/ml) จำปี ($IC_{50} = 0.47$ mg/ml) เก๊กฮวย ($IC_{50} = 0.56$ mg/ml) เข็มเหลือง ($IC_{50} = 0.62$ mg/ml) และชบา ($IC_{50} = 0.67$ mg/ml) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากดอกไม้ที่เหลือมีค่า $IC_{50} > 1$ mg/ml โดยที่สารสกัดจากดอกกรำเพยมีฤทธิ์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า % Inhibition ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.62 ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

วิธี ABTS cation radical scavenging assay พบว่าสารสกัดจากดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ($IC_{50} = 0.22$ mg/ml) รองลงมาได้แก่ สารสกัดจากดอกพวงชมพู ($IC_{50} = 0.24$ mg/ml) กุหลาบมอญ ($IC_{50} = 0.56$ mg/ml) บัวหลวง ($IC_{50} = 0.59$ mg/ml) ดาวกระจาย ($IC_{50} = 0.62$ mg/ml) เข็มแดง ($IC_{50} = 0.68$ mg/ml) และจำปา ($IC_{50} = 0.69$ mg/ml) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากดอกไม้ที่เหลือมีค่า $IC_{50} > 1$ mg/ml โดยที่สารสกัดจากดอกแคขาวมีฤทธิ์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า % Inhibition ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.77 ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

จากการทดสอบฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ของสารสกัดจากทั้ง 2 วิธี พบว่า ดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ดีที่สุด ตามด้วย ดอกพวงชมพู และดอกบัวหลวงเป็นอันดับที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

จากการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้ง 5 ด้วยวิธี HPLC พบว่าดอกพวงชมพูมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด (CA = 11.86 mg/g และ EA = 11.85 mg/g โดยรวม = 23.71 mg/g) รองลงมาได้แก่ ดอกบัวหลวง (CA = 7.03, RU = 4.89, EA = 5.18, QU = 0.68 mg/g, โดยรวม = 17.78 mg/g) และ ดอกหางนกยูงไทย (GA = 2.07, CA = 3.69, RU = 6.21, EA = 3.63 mg/g และ โดยรวม 15.60 mg/g) ส่วนดอกไม้ชนิดอื่นมีสารฟีนอลิกโดยรวม อยู่ต่ำกว่า 10 mg/g ซึ่งสอดคล้องกับผลของการหาปริมาณ Total phenolic compounds และเมื่อนำปริมาณสารฟีนอลิกไปเปรียบเทียบกับฤทธิ์ antioxidant จะได้ว่า ดอกหางนกยูงไทยมีปริมาณ สารฟีนอลิกทั้ง 5 น้อยกว่าดอกพวงชมพูและดอกบัวหลวง แต่กลับมีฤทธิ์ antioxidant มากที่สุด อาจเป็นไปได้ว่าในสารสกัดหางนกยูงมีสารที่มีฤทธิ์ antioxidant ตัวอื่นนอกจากสารฟีนอลิกทั้ง 5

การหาปริมาณ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ในสารสกัดจากดอกไม้ และฤทธิ์ในการเป็น free radical scavenging.

สุวรรณา วรรัตน์, วีระศักดิ์ สามี, ชญานิศ ศรีชัยวิชวงศ์

บทคัดย่อ

ดอกไม้ที่พบในประเทศไทย 22 ชนิดถูกนำมาสกัดด้วย ethanol แล้วนำสารสกัดแห้งที่ได้จากการระเหยเอาตัวทำละลายออกมาทดสอบฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay พบว่า ดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ที่ดีที่สุด (*Caesulpinia pulcherrima*, $IC_{50} = 0.09-0.22$ mg/ml) ตามด้วย ดอกพวงชมพู (*Antigonon leptopus* Hook. & Arn., $IC_{50} = 0.15-0.24$ mg/ml) และดอกบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*, $IC_{50} = 0.30-0.59$ mg/ml) การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ 5 ตัวที่เป็นสารฟีนอลิก อันได้แก่ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ด้วยวิธี HPLC พบว่าดอกพวงชมพูมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด (CA = 11.86 mg/g และ EA = 11.85 mg/g โดยรวม = 23.71 mg/g) รองลงมาได้แก่ ดอกบัวหลวง (CA= 7.03, RU= 4.89, EA= 5.18, QU=0.68 mg/g, โดยรวม = 17.78 mg/g) และดอกหางนกยูงไทย (GA= 2.07, CA= 3.69, RU= 6.21, EA= 3.63 mg/g และ โดยรวม 15.60 mg/g) ส่วนดอกไม้ชนิดอื่นมีสารฟีนอลิกโดยรวม อยู่น้อยกว่า 10 mg/g

Quantification of gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin and quercetin from the ethanolic extract of flowers and their effects on free radical scavenging activity.

Vorarat S., Samee W., Sornchaithawatwong C.

Abstract

Flowers founded in Thailand 22 types were extracted with ethanol and then dried. The crude extract of each flower was test for antioxidant activity using DPPH radical scavenging assay and ABTS cation radical scavenging assay. It was founded that *Caesulpinia pulcherrima* has highest activity ($IC_{50} = 0.09-0.22$ mg/ml) following with *Antigonon leptopus Hook. & Arn.* ($IC_{50} = 0.15-0.24$ mg/ml) and *Nelumbo nucifera* ($IC_{50} = 0.30-0.59$ mg/ml). Five phenolic compounds; gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin and quercetin, in crude extract were determined with optimised HPLC method. *Antigonon leptopus Hook. & Arn* has highest amount of catechin and ellagic acid (CA = 11.86 mg/g, EA = 11.85 mg/g, total = 23.71 mg/g). *Nelumbo nucifera* has CA= 7.03, RU= 4.89, EA= 5.18, QU=0.68 mg/g and total = 17.78 mg/g which these phenolic amount is in the second rank. The third one was *Caesulpinia pulcherrima* (GA= 2.07, CA= 3.69, RU= 6.21, EA= 3.63 mg/g total=15.60 mg/g). Other flowers' crude extract have total of five phenolic compounds less than 10 mg/g.

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ก
สรุปโครงการ (Executive Summary)		ข
บทคัดย่อภาษาไทย		จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญตาราง		ซ
สารบัญรูป		ฅ
บทที่		
1	บทนำ	1
2	ทบทวนวรรณกรรม	5
3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการที่ศึกษา	20
4	ผลการวิจัย	28
5	วิจารณ์ผลการวิจัย	59
6	ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	61
เอกสารอ้างอิง		63
ภาคผนวก	งานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์	64

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	% yield ของสารสกัดหยาบที่ได้จากดอกไม้แต่ละชนิด	28-29
ตารางที่ 2	แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC ₅₀ ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay	34-39
ตารางที่ 3	แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC ₅₀ ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (trolox) ด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay	41-45
ตารางที่ 4	แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay	48-49
ตารางที่ 5	แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดจากดอกไม้ 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay	49
ตารางที่ 6	แสดงค่าความสัมพันธ์สมการเส้นตรง (Linear regression equation) correlation coefficient และ detection limit ของสาร	53
ตารางที่ 7	แสดงค่าความแม่นยำ ทั้ง Intra-day Precision (n=5) และ Inter-day precision (n = 5 days)	54
ตารางที่ 8	8 แสดงค่า %Recoveries ของสารฟีนอลิกทั้ง 5 (n=5) ที่ได้จาก การ spike สารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงในสารสกัดดอกไม้ 3 ชนิด	55
ตารางที่ 9	แสดงค่าปริมาณของสารฟีนอลิกทั้ง 5 ในสารสกัดดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด	57

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงโครงสร้างของสารฟีนอลิก	3
รูปที่ 2	แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH· กับสารต้านอนุมูลอิสระ	7
รูปที่ 3	แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ABTS· กับสารต้านอนุมูลอิสระ	7
รูปที่ 4	กระบวนการเกิดเมลานิน โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	9
รูปที่ 5	แผนผังแสดงการเกิดเมลานิน 2 ชนิดคือ eumelanin และ pheomelanin	10
รูปที่ 6	ภาพแสดงดอกไม้ทั้ง 2 ชนิด	18-19
รูปที่ 7-10	TLC plate แสดง finger print ของดอกไม้ 2 ชนิด	31-32
รูปที่ 11	กราฟแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกไม้ 2 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) โดยวิธี DPPH radical scavenging method	40
รูปที่ 12	กราฟแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกไม้ 2 ชนิดและสารมาตรฐานโดยวิธี ABTS cation radical scavenging assay	47
รูปที่ 13	กราฟแสดง Standard curve ของ Gallic acid	50
รูปที่ 14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE และ % Inhibition ของสารสกัด	51
รูปที่ 15	โครมาโตแกรมของการแยกสารฟีนอลิกทั้ง 5 ตัว	52
รูปที่ 16	HPLC chromatograms ของสารสกัด (a) ดอกจำปี (<i>M. alba</i>), (b) ดอกหางนกยูงไทย (<i>C. pulcherrima</i>) และ (c) บัวหลวง (<i>N. nucifera</i>)	56

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาทางวิจัย

นักวิจัยพบว่าปฏิกิริยา Oxidation เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คนเราแก่ก่อนวัยสูญเสียความจำ มีความผิดปกติของสายตา ระบบภูมิคุ้มกันต่ำ และกระดูกไม่แข็งแรง ร่างกายเราใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญอาหารเพื่อให้เกิดพลังงาน ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า Oxidation พบว่าการส่งผ่านประจุไฟฟ้า หรือ electron ของปฏิกิริยา Oxidation ก่อให้เกิดพลังงานและอนุมูลอิสระ(Free radical)

อนุมูลอิสระคือโมเลกุลที่มี electron ขาดหายไป 1 ตัว เมื่อ electron หายไป 1 ตัว ก็จะไม่คงสภาพ สสารในโลกนี้จะยอมให้ขาดสมดุลทางไฟฟ้าไม่ได้ ดังนั้น อนุมูลอิสระจะดึงเอา electron จากโมเลกุลข้างเคียงมาเข้าคู่กับตัว เพื่อทำให้เกิดความเสถียรหรือคงสภาพเซลล์ หรือโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระแย่ง electron ไปก็จะขาด electron และกลายเป็นอนุมูลอิสระเสียเอง จึงไปแย่งเอา electron จากสิ่งที่อยู่ข้างเคียงมาเข้าคู่กับตัวเองเช่นกัน ก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากปฏิกิริยา Oxidation แล้ว เราสามารถได้รับอนุมูลอิสระจากแหล่งอื่นๆเช่น

- 1) จากมลพิษในอากาศที่เราหายใจเข้าไปไม่ว่าจะเป็นสารตะกั่ว คาร์บอนมอนอกไซด์ ควันทูบหรี่ ควันทนดิน ควันท่อไฟ
- 2) จากอาหารที่เรากินเข้าไปในรูปของสารเคมีเกือบทุกชนิด เช่น สารแต่งสี สารปรุงรส และสารกันบูด
- 3) อุจจาระที่หมักหมมในลำไส้ใหญ่ของเราเอง การที่อุจจาระค้างคั่ง ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายกากอาหารต่อไปจึงเกิดการบูดเน่าและเกิด อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามร่างกายเรามีเอนไซม์และสารเคมีบางตัวที่สามารถลดความรุนแรงของปฏิกิริยา Oxidation โดยการทำให้อนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นกลาง (neutralizing of free radical) สารเคมีพวกนี้เรียกว่า Antioxidant ซึ่ง Antioxidant บางตัวร่างกายสร้างขึ้นมาได้ แต่ส่วนมากเราได้จากธาตุอาหารที่เรากินเข้าไป

ความเหี่ยวแห้งของส่วนต่างๆ ของร่างกาย หรือความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ เกิดมากยิ่งขึ้นเมื่อเรามีอายุมากขึ้น แต่เราก็มีผักและผลไม้จำนวนมากที่มีคุณสมบัติเป็น Antioxidant สารที่เป็น Antioxidant ได้แก่ วิตามิน C, E และเบต้า-แคโรทีน ธาตุต่างๆ เช่น ซีลีเนียม แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี ไฟโตเคมีคอล หรือไฟโตนิวเทรียนต่างๆ เช่น แคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็น กลุ่มสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นทำให้เกิดสีอันสดใสของผักและผลไม้ เช่น สีเหลือง แดง น้ำเงิน เกิดจากสารในกลุ่มนี้

หน้าที่และบทบาทของฟลาโวนอยด์

1. เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่ป้องกันการเกิดต่อกระดูก ป้องกันการแก่ก่อนวัย
2. ลดการอักเสบ (Inflammatory) ของเซลล์เยื่อหุ้มสมอง ดังนั้น จึงลดอัตราการเกิดโรคพาร์กินสัน และโรคความจำเสื่อม เพราะสาเหตุหลักของทั้ง 2 โรคนี้เกิดจากการอักเสบของเซลล์เยื่อหุ้มสมอง กลไกที่ Flavonoid ลดการอักเสบโดยการทำให้น้ำเยื่อ cell หุ้มสมองที่แข็งอ่อนตัวลง
3. ป้องกันโรคหัวใจ เพราะ Flavonoid จะไปลดกิจกรรมของเมีดเลือดที่ทำให้เลือดแข็งตัว นอกจากนี้ Flavonoid จะทำหน้าที่เคลือบหลอดเลือดแดง อุปมาเหมือนสารเทปลอนที่เคลือบหม้อ เพื่อป้องกันการสะสมของไขมัน และยังช่วยเพิ่มระดับ HDL (High density lipoprotein) หรือคอเลสเตอรอลที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายอีกด้วย

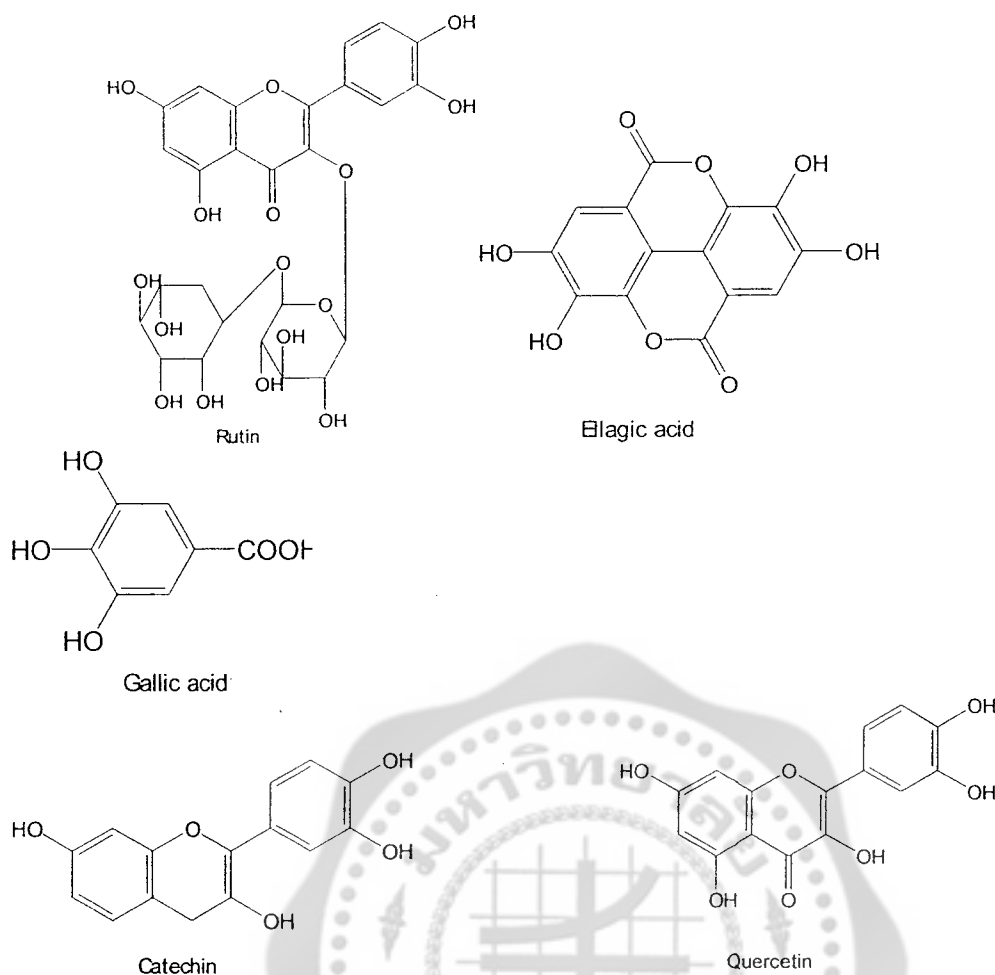
4. แก้อาการคันโลหิตสูง

5. ป้องกันโรคมะเร็ง

6. ป้องกันการติดเชื้อของแบคทีเรีย

แหล่งของสารฟลาโวนอยด์ บลูเบอร์รี่ สตรอเบอร์รี่ องุ่นคองคอร์ด ไวน์แดง นอกจากนี้ flavonoids เป็นกลุ่มสารที่ให้สีสรรแก่พืช รวมถึงสีสรรสวยงามของกลีบดอกไม้ สารกลุ่มนี้สามารถดูดซับรังสี ultraviolet ได้ดีและเปล่งออกมาเป็นแสงสีต่าง ๆ ของดอกไม้

สารฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างหลักเป็น phenolic ที่มีหมู่ hydroxy มากกว่า 1 อยู่บน aromatic ring (รูปที่ 1) เช่น gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin, quercetin kaempferol, myricetin เป็นต้น



รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างของสารฟีนอลิก 5 ชนิด คือ Rutin, Ellagic acid, Gallic acid, Catechin และ Quercetin

จะเห็นได้ว่าสารฟลาโวนอยด์หรือในบางครั้งเรียกระบบสารฟีนอลิกมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการชะลอความแก่ จึงได้มีการวิจัยอย่างกว้างขวางเพื่อที่จะหาสารที่มีฤทธิ์เหล่านี้ โดยเฉพาะสารจากธรรมชาติซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรที่อุดมสมบูรณ์ และมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อย เช่น สารจากส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ใบ ผล และเปลือกต้น เป็นต้น แต่มีงานวิจัยไม่มากนักที่ให้ความสนใจศึกษาสารที่มีฤทธิ์จากดอกไม้ ดังนั้นในโครงการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกดอกไม้มาทำการสกัดสารสำคัญและนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านฤทธิ์ดังกล่าว

จากนั้นนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มาทำการหาปริมาณสารฟีนอลิก (gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin) โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถแยกสารฟีนอลิก ทั้ง 5 ตัวและสามารถหาปริมาณสารทั้ง 5 ตัวได้ในคราวเดียวกัน

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะทำการคัดเลือกดอกไม้ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อให้ได้สารสำคัญที่น่าสนใจสำหรับที่จะทำการทดลองศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคต และยังได้วิธีการวิเคราะห์ที่สามารถหาปริมาณสารสำคัญได้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 ทราบแหล่งสารฟีนอลิกที่จะพบได้มากในดอกไม้ชนิดใด
- 2.2 พัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือ
- 2.3 ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกไม้แต่ละชนิด

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาในดอกไม้ที่มีอยู่และพบได้ง่ายในประเทศไทย ประมาณ 20 ชนิด โดยศึกษาองค์ประกอบของสารฟีนอลิกในดอกไม้และฤทธิ์ของสารสกัดในการเป็นสารต้านออกซิเดชันและการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ในสารสกัดดอกไม้ด้วยเทคนิค HPLC

4. ประโยชน์ที่ได้รับ

- 4.1 ผลสำเร็จของการวิจัย
 - 4.1.1 เป็นแนวทางในการนำสมุนไพรดอกไม้ไทยมาใช้ในการเพิ่มคุณค่า
 - 4.1.2 ได้แหล่งสารฟีนอลิกจากดอกไม้
 - 4.1.3 ได้วิธีการแยกสารฟีนอลิก
- 4.2 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์
มหาวิทยาลัยหรือสถาบันการศึกษา

5. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

กลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ นักวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ เกษษกร หรือ ผู้ที่สนใจอื่นๆ
ทำการเผยแพร่ผลการวิจัยในรูปของการใช้สื่อเผยแพร่ การตีพิมพ์ผลงานในรูปหนังสือหรือวารสาร และการนำเสนอผลงานทางวิชาการ

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ความแก่ของผิวหนังจะแสดงออกให้เห็นเป็นริ้วรอยเหี่ยวย่น หย่อนยานและหยาบกร้าน นอกจากลักษณะภายนอกที่เห็นได้ด้วยตาแล้ว หน้าที่และการทำงานของผิวหนังก็ยังลดลงด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากองค์ประกอบของผิวหนังที่เปลี่ยนแปลงไป สามารถแบ่งความแก่ของผิวหนังตามสาเหตุต่างๆ ได้ดังนี้

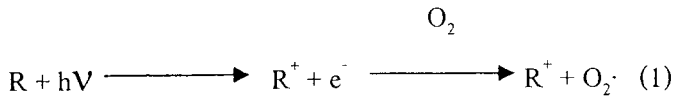
1. ความแก่ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (Intrinsic aging) ถูกกำหนดโดยสารทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับอวัยวะอื่นๆ ของร่างกาย โดยเป็นปัจจัยภายในร่างกายที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น เซลล์สร้างเม็ดสี (melanocyte) มีจำนวนลดลง 8-20% ในทุก 10 ปี หลังอายุ 30 ปี เป็นต้น

2. ความแก่ที่เกิดจากปัจจัยภายนอก (Extrinsic aging, Premature aging or Photoaging) ปัจจัยภายนอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังตามวัยด้วย เช่น สารเคมี ความร้อน และแสงแดด โดยแสงแดดสามารถทำลายผิวให้แก่ก่อนวัยได้หากได้รับสะสมเป็นเวลานาน ดังที่ปรากฏให้เห็นในบริเวณที่ได้รับแสงแดดอยู่เสมอ เช่น ใบหน้า ลำคอ และหลังมือ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าปัจจัยภายนอกเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้ผิวถูกทำลายร่วมกับขบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

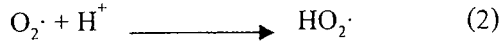
มีสมมติฐานและทฤษฎีเกี่ยวกับความแก่มาหลาย เช่น ทฤษฎีการกำหนดทางพันธุกรรมที่เชื่อว่าอายุ และกระบวนการแก่ของคน ถูกกำหนดไว้โดยสารทางพันธุกรรมตั้งแต่ขั้นตอนการปฏิสนธิในครรภ์มารดา ทฤษฎีการกลายพันธุ์ที่เชื่อว่าการกลายพันธุ์ซึ่งเกิดจากปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ spontaneous hydrolysis การเหนี่ยวนำโดยสารเคมีหรือรังสี และการเหนี่ยวนำโดยอายุ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสะสมในโครงสร้างของ DNA ซึ่งส่งผลให้เซลล์เปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งหรือตาย และทฤษฎีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในปัจจุบันคือ ทฤษฎีอนุมูลอิสระ (free radical theory) ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่มีความไวสูงและไม่คงตัว มีอิเล็กตรอนอิสระในวงนอกสุด ซึ่งคอยจับอิเล็กตรอนของสารอื่นและทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ก่อให้เกิดการทำลายส่วนประกอบของเซลล์ เช่น โปรตีน คอลลาเจน และ hyaluronic acid เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์และกรดนิวคลีอิก และเกิดการออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เซลล์เมมเบรนถูกทำลาย โดยการทำลายองค์ประกอบเซลล์เหล่านี้เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งและความแก่

โดยทั่วไปอนุมูลอิสระเกิดจากโมเลกุลที่มีความไวต่อแสง เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีแสงและออกซิเจน พบว่าอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกายเป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน ได้แก่ superoxide radical ($O_2\cdot^-$), hydroperoxy radical ($HO_2\cdot^-$) และ hydroxyl radical ($OH\cdot^-$) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการเกิด ดังนี้

1. superoxide radical เกิดจากการรับ e^- ของโมเลกุล O_2 ดังปฏิกิริยาที่ 1

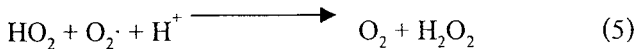
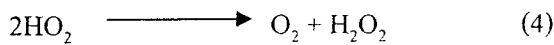


2. hydroperoxy radical เกิดจาก superoxide radical จับกับ โปรตอน ดังปฏิกิริยาที่ 2



superoxide radical และ hydroperoxy radical เกี่ยวข้องในการเกิด H_2O_2

ดังปฏิกิริยาที่ 3- 5



3. hydroxyl radical เป็นสารที่ไวที่สุด เกิดดังปฏิกิริยาที่ 6



จากปฏิกิริยาดังกล่าว จะเห็นได้ว่าอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดได้ตลอดเวลา และเป็นส่วนประกอบตามปกติของสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปแล้วร่างกายจะมีสารที่คอยควบคุมระดับของอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่ให้มากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ คือ superoxide dismutase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่หยุดปฏิกิริยาของอนุมูล superoxide และ hydroperoxide โดยเปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide และออกซิเจน ส่วน catalase เป็นเอนไซม์ที่รีดิวส์ hydrogen peroxide ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน (1)

สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. True antioxidant เป็นสารที่สามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระแล้วเกิดเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปอีกได้ เช่น propyl gallate, butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxyl toluene (BHT) และ vitamin E เป็นต้น

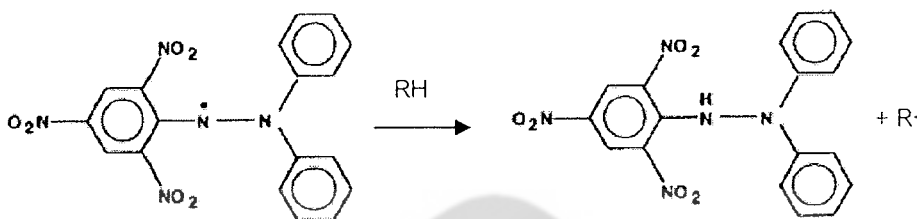
2. Reducing agent เป็นสารที่มีค่า standard oxidation potential (SOP) สูง จึงถูกออกซิไดส์ได้ เช่น sodium metabisulfite, sodium bisulfite, sodium sulfite และ ascorbic acid เป็นต้น

3. Synergist เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยตัวเองได้น้อยมาก แต่ให้ผลดีหากใช้ร่วมกับ true antioxidant โดยคาดว่า synergist เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่ true antioxidant ที่ถูกใช้ไปแล้วให้กลับไปอยู่ในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้อีก สารที่เป็น synergist ได้แก่ citric acid, vitamin C, tartaric acid, lecithin และ phosphoric acid เป็นต้น

4. Chelating agent เป็นสารที่รวมตัวกับโลหะหนัก ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารในกลุ่ม chelating agent จึงช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระตั้งแต่ช่วง initial step ได้ เช่น ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) เป็นต้น (2)

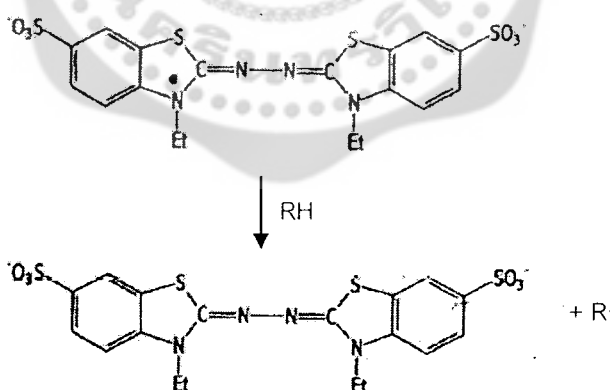
ในปัจจุบันมีวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายวิธี เช่น DPPH radical scavenging assay, ABTS cation radical scavenging assay, β -carotene bleaching method และ Electron spin resonance (ESR) เป็นต้น (3) โดยงานวิจัยนี้กล่าวถึงหลักการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธีคือ

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay มีหลักการคือ สารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ antioxidant จะเปลี่ยน DPPH \cdot ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 520 nm ไปเป็น DPPH ซึ่งไม่เกิดการดูดกลืนแสง จึงสามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงด้วยเครื่อง Spectrophotometer สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังรูปที่ 2



รูปที่ 2. แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH \cdot กับสารต้านอนุมูลอิสระ (4)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS cation radical scavenging assay มีหลักการคล้ายกับวิธีที่ 1 คือ เมื่อสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ antioxidant จะเปลี่ยน ABTS \cdot ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 734 nm ไปเป็น ABTS ซึ่งไม่เกิดการดูดกลืนแสง จึงสามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงด้วยเครื่อง Spectrophotometer สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังรูปที่ 3

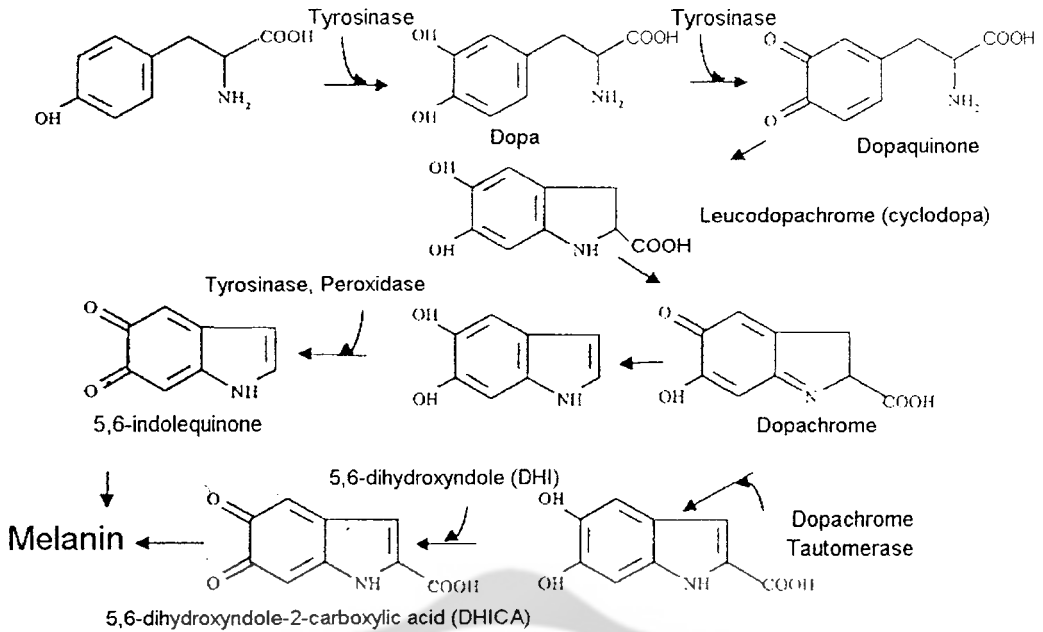


รูปที่ 3. แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ABTS \cdot กับสารต้านอนุมูลอิสระ (5)

นอกจากพิษภัยของอนุมูลอิสระที่มีต่อผิวหนังแล้ว ปัญหาผิวหมองคล้ำนับเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นได้บ่อย ซึ่งเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของผิวหนังดังนี้ (6)

โครงสร้างของผิวหนังแบ่งเป็น 3 ชั้นคือ หนังกำพร้า หนังแท้และชั้นรองรับผิวหนัง

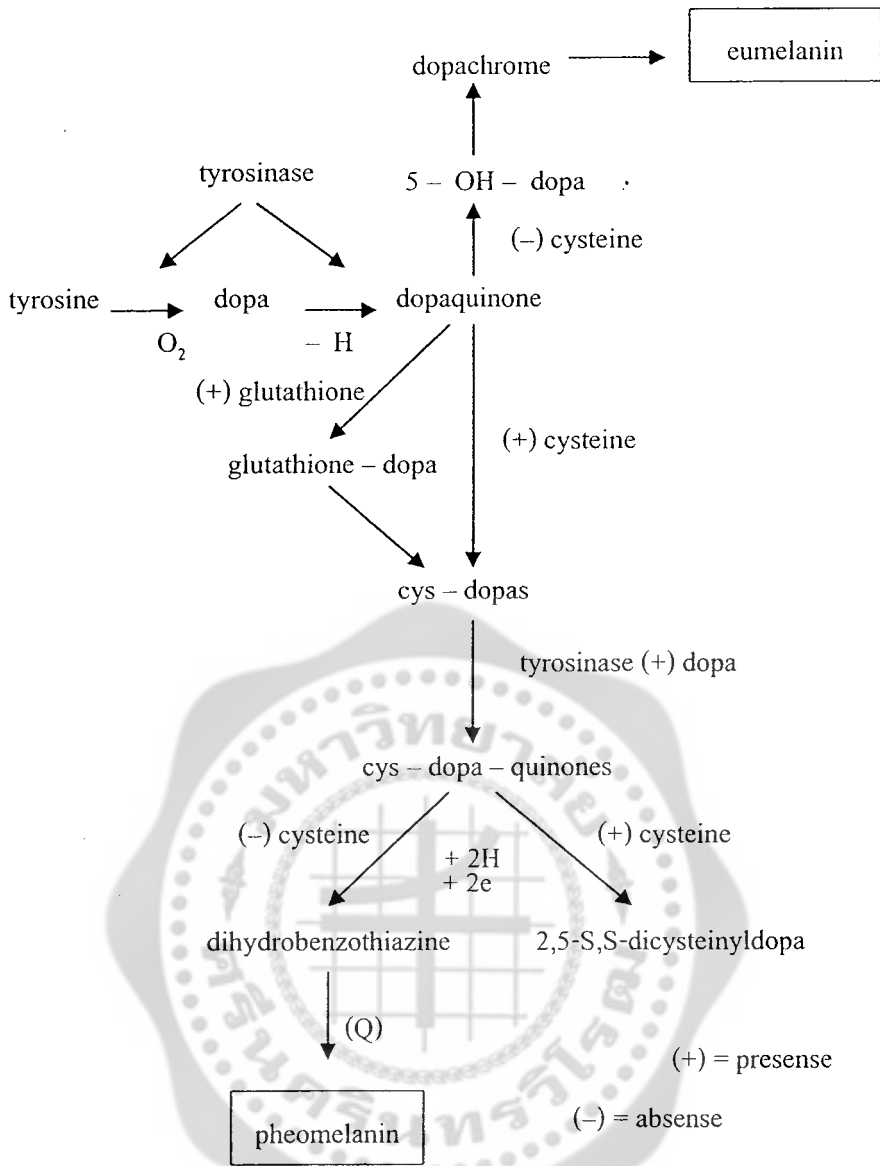
1. ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) เป็นผิวหนังชั้นนอกสุดประกอบด้วย ชั้นย่อย 4-5 ชั้น โดยในผิวหนังชั้นนี้มีเซลล์ที่สำคัญ 3 ชนิด คือ Melanocytes ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีหรือเมลานิน ซึ่งช่วยปกป้องผิวจากแสงแดด Langerhan's cells ทำหน้าที่คล้าย macrophage ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง และ Merkel cells ทำหน้าที่เป็นเซลล์ประสาทในชั้นหนังกำพร้า
2. ชั้นหนังแท้ (Dermis) ผิวหนังชั้นนี้ประกอบด้วย หลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาท รากผมหรือขน ต่อมเหงื่อ ต่อมกลิ่น และกลุ่มเนื้อเยื่อมากมาย มีบทบาทเกี่ยวกับการแพ้และการอักเสบของผิวหนัง
3. ชั้นรองรับผิวหนัง (Subcutaneous) ผิวหนังชั้นนี้ประกอบด้วย เนื้อเยื่อไขมันซึ่งช่วยป้องกันอวัยวะภายในจากการถูกกระแทก และเป็นที่สะสมไขมันในร่างกาย จากโครงสร้างของผิวหนังดังกล่าว ส่วนที่เป็นตัวกำหนดสีผิวคือ “เมลานิน” ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ในชั้นหนังกำพร้า โดยขบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน เกิดขึ้นตั้งแต่ตอนเป็นทารกในครรภ์และเกิดต่อเนื่องไปตลอดชีวิต หากเกิดความผิดปกติขึ้นในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งแล้ว จะทำให้เกิดความผิดปกติของสีผิวได้ โดยเซลล์สร้างเม็ดสีหรือ Melanocyte ที่พบที่ชั้นล่างสุดของชั้นหนังกำพร้า จะสร้างและห่อหุ้ม Melanosome ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์น้ำตาล (Brown organelles) ที่ภายในประกอบด้วย เอนไซม์ออกซิเดสที่ชื่อว่า Tyrosinase มีคอปเปอร์อยู่ในโมเลกุล (Copper containing enzyme) เอนไซม์นี้เป็นตัวสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยสามารถเร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโน Tyrosine ในผิวหนังให้เป็น Dopa ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น Dopaquinone โดยปฏิกิริยา Hydroxylation และ Oxidation ตามลำดับ ตามด้วยการเปลี่ยน Dopaquinone ผ่าน Intermediate อีกหลายตัว จากนั้นเกิด Polymerization ได้เป็นเมลานิน ซึ่งปรากฏเป็นสีผิวขึ้น ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4. กระบวนการเกิดเมลานิน โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

เมลานินที่สร้างขึ้นที่ผิวหนังมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีสีดำหรือสีน้ำตาลเรียกว่า eumelanin ซึ่งเป็นกลุ่มเม็ดสีที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและไม่ละลายน้ำ (Insoluble nitrogenous) โดย eumelanin มีองค์ประกอบหลักคือ 5,6-dihydroxyindole ส่วนชนิดที่มีสีเหลืองหรือสีส้มเรียกว่า pheomelanin สำหรับกระบวนการเกิดเมลานินทั้ง 2 ชนิดแสดง ดังรูปที่ 5

กระบวนการสร้างเมลานินทั้ง 2 ชนิดจะแตกต่างกัน หลังจากที tyrosine ผ่านกระบวนการ hydroxylation และ oxidation ไปเป็น dopaquinone แล้ว โดยการสร้าง eumelanin จะเกิดผ่านกระบวนการ auto-oxidation ผ่านตัวกลาง leucodopachrome, dopachrome, 5,6-dihydroxyindole และ 5,6-indolequinone ตามลำดับ จนเกิดเป็นกลุ่มเม็ดสีดำหรือสีน้ำตาล แต่ถ้ากรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ในโมเลกุล เช่น cysteine และ glutathione ที่ผิวหนังเข้าทำปฏิกิริยากับ dopaquinone ด้วย sulfhydryl linkage จะเกิดเป็น pheomelanin



รูปที่ 5. แผนผังแสดงการเกิดเมลานิน 2 ชนิดคือ eumelanin และ pheomelanin (7)

ในแต่ละบุคคลจะมีสัดส่วนของ eumelanin และ pheomelanin มากน้อยแตกต่างกัน จึงทำให้เกิดสีผิวต่างกันได้หลายแบบ เช่น ผิวสีน้ำตาล ดำเหลือง และขาวอมชมพู เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ

1. ปัจจัยทางพันธุกรรม เช่น คนอเมริกันหรือยุโรปมีสีผิวขาวอมชมพู คนแอฟริกันมีผิวสีดำ และคนเอเชียมีผิวสีขาวอมเหลือง เป็นต้น
2. ปัจจัยทางฮอร์โมน โดยเมื่อภาวะร่างกายเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น การตั้งครรภ์ หรือการรับประทานยาคุมกำเนิด จะกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมน MSH มากขึ้น ส่งผลให้มีการสร้างเม็ดสีมากขึ้นด้วย

3. ปัจจัยภายนอกที่สำคัญได้แก่ รังสี UV ซึ่งมีมากในแสงแดดสามารถกระตุ้นเซลล์สร้างเม็ดสีเมลานินให้เพิ่มขึ้นได้ พบว่าผู้ที่โดนแสงแดดจะมีสีผิวคล้ำขึ้นเนื่องจากกลไกตามธรรมชาติในการป้องกันผิวหนัง

สังคมนาเซียมีค่านิยมขึ้นชอบผิวขาวเพราะแลดูสะอาดตา ดังนั้นเมื่อเกิดภาวะผิวสีคล้ำ เช่น จากแสงแดดหรือจากการกระตุ้นของฮอร์โมน จะทำให้เกิดปัญหาด้านความงามจึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาวออกมาใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวจะประกอบด้วยสารที่มีผลเปลี่ยนแปลงกระบวนการสร้างเมลานินในชั้นตอนใดชั้นตอนหนึ่ง โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินแตกต่างกันดังนี้ (8)

1. การป้องกันรังสี UV ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเมลานิน เช่น sunscreen agents ชนิดดูดซับรังสียูวีไว้ในโมเลกุลได้แก่ UV-A absorber, UV-B absorber และสารอนินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสะท้อนและกระจายแสงได้แก่ titanium dioxide
2. การยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น biomein และ placenta extract
3. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีคุณสมบัติเป็น chelating agent เข้าจับกับคอปเปอร์ในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส หรือเป็น competitive inhibitor กับเอนไซม์ ไทโรซิเนส เช่น kojic acid, arbutin และ licorice extract
4. การเป็นพิษต่อเมลาโนไซต์ (melanocyte) เช่น hydroquinone ซึ่งปัจจุบันมีการห้ามใช้สารนี้ในเครื่องสำอางเนื่องจากมีผลข้างเคียงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้เกิดฝ้าถาวรบนใบหน้า
5. การใช้สารที่มีคุณสมบัติกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งมีผลลดการสร้างเมลานิน เช่น วิตามินอี (α-tocopherol)

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

กล้วยไม้หวาย

ชื่ออื่น ๆ เอื้อง (ภาคเหนือ)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrobium Sonia*.

ชื่อวงศ์ Orchidaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีลำต้นเป็นข้อปล้อง ผิวเปลือกเรียบ บางสีเขียว การเจริญของลำต้นโดยการแยกหน่อออกจากข้อ ใบเรียงตัวสลับกันตามข้อ ลักษณะใบเรียบสีเขียว ขนาดของใบและลักษณะอื่นๆ แตกต่างกันไปตามชนิดพันธุ์ ดอกออกเป็นช่อตามส่วนยอดหรือข้อของลำต้น ช่อหนึ่งมีดอกประมาณ 10-30 ดอก ลักษณะดอกมีเดือยอยู่ตรงกลาง กลีบดอกแยกออกเป็นส่วน ๆ เรียงตัวกันรอบเกสร มีกลีบดอกประมาณ 5 กลีบ ซึ่งมีสีสันและขนาดของดอกแตกต่างกันไปตามชนิดพันธุ์

กุหลาบมอญ

ชื่ออื่น ๆ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rosa damascerna*

ชื่อวงศ์ Rosaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กุหลาบจัดเป็นไม้ดอกประเภทพุ่มผลัดใบ มีลำต้นตั้งตรงหรือเลื้อย มีใบย่อย 3-5 ใบ มีสีเขียวเข้ม เป็นมันและมีรอยย่นเล็กน้อย ดอกมี 2 เพศในดอกเดียวกัน มีเกสรตัวผู้และตัวเมียเป็นจำนวนมาก มีทั้งดอกชั้นเดียวและดอกซ้อน

เก๊กฮวย

ชื่ออื่น ๆ เบญจมาศสวน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Chrysanthemum indicum* Linn.

ชื่อวงศ์ Compositae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ล้มลุก อายุหลายปี ลำต้นตรงเป็นร่องค่อนข้างเกลี้ยง ใบออกเรียงสลับกัน ปลายแหลม ขอบจักเป็นพู่ลึกคล้ายขนนก ขอบพู่จักเป็นซี่ฟันจำนวนมาก สีค่อนข้างเขียว ทั้งสองด้าน ดอกเป็นกระจุกสีเหลือง มีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อที่ปลายยอดหรือง่ามตามใบ ก้านช่อดอกสั้น ผลแห้งรูปไข่กลับ เกลี้ยง

เข็ม

ชื่ออื่น ๆ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ixora spp.*

ชื่อวงศ์ Rubiaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เข็มเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กถึงขนาดย่อม ลำต้นสูงประมาณ 3-5 ฟุต จะแตกกิ่งก้านสาขาออกแผ่เป็นพุ่ม ใบของดอกเข็มแข็งและเปราะง่าย มีสีเขียวสด ลักษณะใบมนรี ปลายใบแหลม โคนใบมน ใบจะออกเรียงสลับกันคนละทิศทาง ดอกออกเป็นช่อใหญ่ จะออกตรง ส่วนยอดของต้น ในแต่ละช่อจะประกอบด้วยดอกขนาดเล็กเป็นหลอด ตรงปลายหลอดจะเป็นกลีบ มีอยู่ 4-5 กลีบ ปลายกลีบแหลม

แค

ชื่ออื่น ๆ แคแกง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Sesbania spp.*

ชื่อวงศ์ Papilionaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แคเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 3-10 เมตร เป็นไม้โตเร็วและมีกิ่งก้านสาขามากเปลือกเป็นสีเทามีรอยขรุขระหนา ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยมีขนาดเล็กเรียงเป็นคู่ ดอกคล้ายดอกถั่ว เป็นช่อและออกที่ซอกใบ แต่ละช่อมี 2-4 ดอกดอกมีสีขาวหรือสีแดง ยาว 6-10 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงเป็นรูปประฆังหรือถ้วย ผลเป็นฝักแบนยาว ประมาณ 8-15 เซนติเมตร ฝักเมื่อแก่จะแตกออก

คำฝอย

ชื่ออื่น ๆ คำ (ทั่วไป) ดอกคำ คำยอง คำยุง คำหุยม (ภาคเหนือ)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Carthamus tinctorius* Linn.

ชื่อวงศ์ Compositae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นสัน เกือบเป็นใบเดี่ยว ไม่มีก้านหรือก้านใบสั้น เรียงสลับ รูปวงรี ขอบขนานหรือรูปใบหอก ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ปลายใบเป็นหนามแหลม ดอกเป็นช่อออกที่ปลายยอด มีดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก กลีบดอกมีสีเหลืองเมื่อแรกออกแล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงอมส้ม ใบประดับแข็งเป็นหนามรองรับช่อดอก ผลเป็นผลแห้ง ไม่แตก เมล็ดเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็กสีขาว

จำปา

ชื่ออื่น ๆ จำปาเขา จำปาทอง จำปาป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Michelia champace* Linn.

ชื่อวงศ์ Magnoliaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จำปาเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นสูงประมาณ 20 ฟุต ไม้ น้ำตาลปนขาวเล็กน้อย ใบสีเขียวใหญ่ เป็นมัน ปลายใบแหลม ดอกจะเป็นดอกเดี่ยว สีเหลืองแก่ มี กลีบอยู่ 8-10 กลีบ โดยจะซ้อนกันเป็น 2 ชั้น

จำปี

ชื่ออื่น ๆ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Michelia alba* DC.

ชื่อวงศ์ Magnoliaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จำปีเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นใหญ่สูงกว่าจำปาเล็กน้อย ใบ เป็นใบเดี่ยว ปลายใบจะแหลม โคนใบมน ดอกเป็นดอกเดี่ยว มีสีขาวคล้าย ๆ กับสีของนางช้าง มี กลีบอยู่ 8-10 กลีบ ซ้อนกัน กลีบดอกเรียกว่าจำปา ยาวประมาณ 2 นิ้ว ตรงกลางดอกมีเกสรเป็นแท่ง กลมเล็ก

ชบา

ชื่ออื่น ๆ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hibiscus rosa-sinensis* Linn.

ชื่อวงศ์ Malvaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ชบาเป็นไม้พุ่มขนาด 1-3 เมตร อาจสูงได้ถึง 7-10 เมตร ใบรูปไข่ กว้าง ปลายใบแหลมเรียว ขอบใบจักหรือขอบใบเรียบ ดอกออกตามซอกใบใกล้ปลายยอด ก้านดอก ยาว กลีบรองดอกมี 2 ชั้น สีเขียว ดอกมีทั้งดอกกลาและดอกซ้อน มีหลายสี ถ้าดอกกลาจะมี 5 กลีบ เกสรตัวผู้เป็นดอกยาวยื่นขึ้นมากกลางดอก ปลายสุดเป็นยอดเกสรตัวเมีย แยกเป็น 5 แฉกสี แดง เกสรตัวผู้ติดรอบ ๆ ดอกเป็นสีเหลือง ออกดอกตลอดปี

ชื่องาน

ชื่ออื่น ๆ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Thunbergia repens* Linn.

ชื่อวงศ์ Acanthaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ชื่องานเป็นไม้พุ่มเตี้ย แตกกิ่งก้านหนาแน่น ใบมน ปลายใบแหลม ดอกมีสีม่วงเข้ม รูปกรวยปากแตร มีกลีบดอก 5 กลีบ ออกดอกตลอดปี

ดาวกระจาย

ชื่ออื่น ๆ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cosmos spp.*

ชื่อวงศ์ Compositae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้พุ่มต้นสูง 3-4 ฟุต ดอกเป็นช่อกระจุกตามซอกใบและปลายกิ่ง ดอกวงนอกเป็นหมัน กลีบดอกมีสีต่างๆ ตั้งแต่สีชมพู ชมพูอมม่วง แดง ขาว ส่วนดอกวงในเป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกเป็นหลอดสี่เหลี่ยมปลายจัก ส่วนมากเป็นดอกชั้นเดียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดอกประมาณ 3 นิ้ว

บัวหลวง

ชื่ออื่น ๆ สัตตบุษย์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Nelumbo nucifera*

ชื่อวงศ์ Nelumbonaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้าและไหล ใบเมื่อยังอ่อนจะลอยปริ่มน้ำ ส่วนใบแก่จะโผล่พ้นน้ำ ก้านใบและก้านดอกมีหนาม ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ชูสูงพ้นผิวน้ำ มีทั้งดอกทรงป้อมและแหลม กลีบดอกมีทั้งชนิดซ้อนและไม่ซ้อน สีขาว ชมพู หรือเหลือง แล้วแต่ชนิดพันธุ์

บานบุรี

ชื่ออื่น ๆ บานบุรีเหลือง บานบุรีหอม บานบุรีแสด

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Allamanda cathartica* L.

ชื่อวงศ์ Apocynaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อย ลำต้นกลม ไม่มีขน เป็นข้อ มียางสีขาว ความสูงทั้งต้นประมาณ 2.0-4.5 เมตร ลักษณะของใบเป็นใบมนรี ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ออกดอกเป็นช่อตามปลายกิ่งของต้น ช่อหนึ่งมีดอกอยู่ประมาณ 5-8 ดอก และจะทยอยกันบาน ดอกมีสีเหลือง

และชมพู ออกตามซอกใบ 1-3 ดอก ถ้าเป็นสีขาว ตรงกลางดอกจะมีสีเหลือง ถ้าเป็นสีชมพู ตรงกลางดอกเป็นสีแดง กลีบดอกชั้นเดียว มีกลีบดอก 5 กลีบ

รำเพย

ชื่ออื่น ๆ กระบอก กระทอก แซะศาลา

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Thevetia peruviana*

ชื่อวงศ์ Apocynaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้พุ่มขนาดเล็กถึงกลางสูง 12-20 ฟุต เป็นไม้ต้นโปร่ง ใบมีขนาดเล็กแต่เรียวยาว ออกใบถี่สลับทิศทางกันตามข้อต้น มีน้ำยางสีขาวชั้นอยู่ในต้นและใบ ขนาดใบยาวประมาณ 6 นิ้ว ดอกออกเป็นช่อ ช่อมีดอกประมาณ 5-8 ดอก แต่จะผลัดกันบานครั้งละ 1-2 ดอก มี 5 กลีบ แต่ละกลีบเรียงเหลื่อมซ้อนกัน เป็นรูประฆัง ขนาดดอกยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร

หางนกยูงไทย

ชื่ออื่น ๆ จำพอ ชมพอแดง ขวางขอย ส้มฝ่อ พญาไม้ฝู หางนกยูงแคะ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Caesalpinia pulcherrima*

ชื่อวงศ์ Caesalpinaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ยืนต้นสูงประมาณ 50 ฟุต ผลัดใบ เปลือกต้นเรียบ เมื่อยังอ่อนมีสีเหลืองพอกแก่กลายเป็นสีน้ำตาล ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกสองชั้น มีใบย่อย 10-20 คู่ ใบขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน ออกดอกเป็นช่อใหญ่ที่ปลายกิ่งหรือกิ่งข้างตามส่วนยอด มี 5 กลีบ มีหลากหลายสีเช่น เหลือง แดง ส้ม กลีบต่างจะมีจุดสีขาวประอยู่บนกลีบ

อัญชัน

ชื่ออื่น ๆ อัญชันป่วง อัญชันบ้าน เอื้องจัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Clitoria ternatea* Linn.

ชื่อวงศ์ Papilionaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพันธุ์ไม้เถาวัลย์เลื้อยล้มลุกขนาดเล็ก ซึ่งมีลำเถาอ่อนและเล็ก ใบประกอบออกสลับแบบขนนก รูปไข่ ปลายมน ดอกออกเป็นช่อ ช่อละประมาณ 2-3 ดอก ดอกมีลักษณะคล้ายดอกถั่ว คือมี 2 กลีบ ดอกเมื่อบานเต็มที่กว้างประมาณ 3.5 เซนติเมตร (9)



Orchid spp.



Rosa damascerna



Chrysanthemum indicum Linn.



Ixora spp.



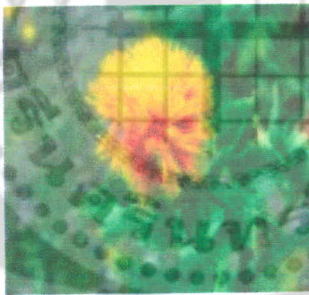
Ixora spp.



Sesbania spp.



Sesbania spp.



Carthamus tinctorius



Michelia champaca



Michelia alba DC.



Hibicus rosa-sinensis Linn.

รูปที่ 6. ภาพแสดงดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด



Thunbergia repens Linn.



Cosmos spp.



Nelumbo nucifera



Allamanda cathartica L.



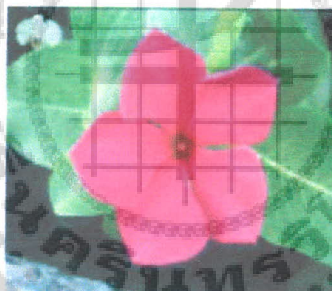
Limonium sinuatum



Antigonon leptopus



Catharanthus rose



Catharanthus rose



Thevetia peruviana



Caesalpinia pulcherrima



Clitoria ternatea Linn.

รูปที่ 6 ภาพแสดงดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด (ต่อ)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

Analytical balance	(Mettler AE 160)
Rotary evaporator	(Buchi Rotavapor R-114)
Evaporator	(Memmert)
Shaker	(Ratek)
Hot air oven	(Contherm)
เครื่องบดสมุนไพร(โกร่ง)	
Sprayer	
TLC developing Tank	(General glassblowing)
TLC aluminum sheets 20x20 cm. Silica gel 60 F ₂₅₄	(Merck)
Thermoplate	(Desaga)
UV spectrophotometer	(Shimadzu UV-1601)
Microplate reader	(Anthos Labtech Instrument, Zenyth200)
Micropipette	(Sealpette [®] Jencons, Sarstedt)
Microtiter plate	(Sero-Wel)
Ultrasonic	(Fritsch)
Vortex mixer	(Vortex genie-2)
เครื่องแก้วชนิดต่างๆ	(Pyrex [®] , USA)
เครื่อง HPLC	(Thermo separation product (TSP), U.S.A
Column C18 (Ø 4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles.	
Filter membrane 0.45 micron nylon	(Filtrex, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

95% Ethanol	(องค์การสุรา กรมสรรพสามิต)
Hexane	(J.T Baker)
Ethyl acetate AR.	(Lab-scan analytical science)
Toluene AR.	(J.T Baker)
Ethanol AR.	(Merck)
Methanol (HPLC grade)	(Merck)
Sulfuric acid	(Lab-scan analytical science)
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	(Sigma)
Quercetin dihydrate	(Fluka)
Gallic acid	Sigma (MO, USA).
Catechin, Ellagic acid, Rutin และ Quercetin	Fluka (Steinheim, Germany)
Acetic acid	Merck (Darmstadt, Germany).
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	(Sigma)
3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA)	(Sigma)
l -ascorbic acid (Vitamin C)	(Univar)
Trolox (C ₁₅ H ₂₀ O ₄)	(Aldrich)
2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	(Fluka)
Potassium persulfate (K ₂ O ₈ S ₂)	(Merck)
Trolox (C ₁₅ H ₂₀ O ₄)	(Aldrich)
Sodium carbonate	(Univar)
Folin-Ciocalteu reagent	(Carlo Erba)

วิธีการศึกษา

การดำเนินการศึกษาแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

- 1 การเตรียมสารสกัดและการทำ TLC fingerprint
- 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการตรวจวัดเชิงปริมาณ
- 3 การหาปริมาณ Total phenolic compounds
- 4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC และการตรวจสอบความเชื่อมั่นและความถูกต้องของวิธี
- 5 หาปริมาณสาร โดยวิธีวิเคราะห์ HPLC ที่พัฒนาได้

1. การเตรียมสารสกัดและการทำ TLC fingerprint

1.1 การเตรียมสารสกัด

- 1.1.1 ทำความสะอาดดอกไม้ทั้ง 22 ชนิดและผึ่งไว้ให้แห้ง จากนั้นอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50-60 °C
- 1.1.2 บดดอกไม้อบแห้งแต่ละชนิดด้วยเครื่องบดให้เป็นผงละเอียด
- 1.1.3 ชั่งดอกไม้ที่บดแล้วชนิดละประมาณ 100 กรัม
- 1.1.4 หมักด้วย ethanol ในอัตราส่วนผงดอกไม้:ethanol เท่ากับ 1:20 ด้วยวิธี Maceration โดยหมักครั้งแรกเป็นเวลา 7 วัน ทำการกรองเก็บสารสกัดไว้ จากนั้นหมักซ้ำอีก 3 วัน แล้วกรองเก็บสารสกัดที่ได้ร่วมกับสารสกัดในครั้งแรก
- 1.1.5 นำสารสกัดที่ได้มาระเหย ethanol ออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ให้ได้สารสกัดหยาบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่ได้

1.2 การทำ TLC finger print

ทำการหา condition ของ solvent system (mobile phase) ที่เหมาะสมกับดอกไม้แต่ละชนิด โดยใช้ Silica gel 60 F₂₅₄ for Thin layer chromatography เป็น stationary phase

- 1.2.1 ทำการ spot สารสกัดจากดอกไม้แต่ละชนิดที่ละลายใน ethanol โดยมีความเข้มข้น 10 mg/ml ด้วย pipette tip ลงบนแผ่น Silica gel 60 F₂₅₄ for Thin layer chromatography
- 1.2.2 นำไป run (develop) ใน TLC tank ที่อิมตัวด้วย solvent system ที่เหมาะสม 2 ระบบคือ Toluene:Ethyl acetate (8:2) และ Hexane:Ethyl acetate (8:3) (10)
- 1.2.3 เมื่อ solvent เคลื่อนที่เป็นระยะทาง 8 cm นำ plate ไปผึ่งไว้ให้แห้ง จากนั้นตรวจสอบ finger print ของสารสกัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm
- 1.2.4 ตรวจสอบ finger print ของสารสกัดแต่ละชนิดด้วย spray reagent คือ 10% H₂SO₄ และ 0.5% DPPH in ethanol และบันทึกผลที่ได้

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการตรวจวัดเชิงปริมาณ

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีทดสอบ 2 วิธี ได้แก่

- ก. DPPH radical scavenging assay
- ข. ABTS cation radical scavenging assay

ก. DPPH radical scavenging assay (4)

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

1.1 การเตรียมสารทดสอบ (test sample)

- เตรียม stock solution ของสารทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 50 ml โดยชั่งสารสกัดหยาบ 250 mg ใน volumetric flask 50 ml ปรับปริมาตรด้วย ethanol
- เจือจาง stock solution ของสารทดสอบแต่ละชนิดให้ได้สารทดสอบที่มีความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/ml

1.2 การเตรียมสารละลาย ethanolic DPPH radical ความเข้มข้น 0.2 mg/ml

- ชั่งสารมาตรฐาน DPPH 20 mg ใน volumetric flask 100 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วย ethanol

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

2.1 เติมสารละลายที่ใช้ทดสอบลงในหลุมของ microtiter 96-well plate ให้ได้ปริมาตรรวมสุดท้ายเป็น 200 μ l (ทำ triplicate) โดยแบ่งชุดการทดสอบเป็น 3 ชุด (ชุด A, B และ C) ดังนี้

ชุด A (test sample) ความเข้มข้นละ 3 หลุม

test sample 100 μ l

ethanolic DPPH radical 100 μ l

ชุด B (blank of test sample) ความเข้มข้นละ 3 หลุม

test sample 100 μ l

ethanol 100 μ l

ชุด C (control) plate ละ 3 หลุม

ethanol 100 μ l

ethanolic DPPH radical 100 μ l

ผสมให้เข้ากัน และ incubate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

หา % Inhibition และ IC_{50} เพื่อเปรียบเทียบกับ standard (BHA, trolox และ vitamin C)

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

ค่า IC_{50} ได้จากการทำ calibration curve ระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้น

ข. ABTS cation radical scavenging assay (11)

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

1.1 การเตรียมสารทดสอบ (test sample)

- เตรียม stock solution ของสารทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 50 ml โดยชั่งสารสกัดหยาบ 250 mg ใน volumetric flask 50 ml และปรับปริมาตรด้วย ethanol

- เจือจาง stock solution ของสารทดสอบแต่ละชนิดให้ได้สารทดสอบที่มีความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mg/ml

1.2 การเตรียมสารละลาย ABTS⁺ (รูป free radical)

- ชั่งสารมาตรฐาน ABTS 38.4 mg ใน volumetric flask 10 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM

- ชั่ง potassium persulfate ($K_2S_8O_{12}$) 3,784.2 mg ใน volumetric flask 100 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 140 mM

- pipet สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM ปริมาตร 5 ml ลงใน beaker จากนั้น pipet สารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 140 mM ปริมาตร 88 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

-เจือจางสารละลายข้างต้นด้วย ethanol ในอัตราส่วนสารละลาย:ethanol เท่ากับ 1:88 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.70 ± 0.02

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay

2.1 แบ่งชุดการทดสอบเป็น 3 ชุด (ชุด A, B และ C) ดังนี้

ชุด A (test sample) ความเข้มข้นละ 3 หลุม

test sample 50 μ l

สารละลาย ABTS⁺ 1000 μ l

ชุด B (blank of test sample) ความเข้มข้นละ 3 หลุม

test sample 50 μ l

ethanol 1000 μ l

ชุด C (control) plate ละ 3 หลุม

ethanol 50 μ l

สารละลาย ABTS⁺ 1000 μ l

2.2 ผสมสารในแต่ละชุดให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที

2.3 pipet สารละลายในแต่ละชุด (A, B และ C) ลงใน microtiter 96-well plate หลุมละ 200 μ l (ทำ triplicate) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

2.4 หา % Inhibition และ IC₅₀ ของสารสกัดจากดอกไม้ เพื่อเปรียบเทียบกับ standard (trolox)

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

ค่า IC₅₀ หาได้จากการ calibration curve ระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้น

3. การหาปริมาณ Total phenolic compounds (3)

หาปริมาณ Total phenolic compounds โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

1.1 การเตรียมสารทดสอบ (test sample)

- แบ่งสารทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสารสกัดจากดอกกล้วยไม้หวาย เก๊กฮวย เข็มเหลือง แคะขาว แคะแดง คำฝอย จำปา จำปี ชบา ช้องนาง บานบุรี บานไม่รู้โรย แพงพวยขาว แพงพวยม่วง ไร่พวยและอัญชัน

เตรียม stock solution ของสารทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 50 ml โดยชั่งสารสกัดหยาบ 50 mg ใน volumetric flask 50 ml ปรับปริมาตรด้วย ethanol

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสารสกัดจากดอกกุหลาบมอญ เข็มแดง ดาวกระจาย บัว พวงชมพู และหางนกยูงไทย

เตรียม stock solution ของสารทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml ปริมาตร 50 ml โดยชั่งสารสกัดหยาบ 12.5 mg ใน volumetric flask 50 ml ปรับปริมาตรด้วย ethanol

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

- ชั่งสารมาตรฐาน Gallic acid 6.8 mg ใน volumetric flask 100 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วย ethanol จะได้ stock solution สารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 0.068 mg/ml

- เจือจาง stock solution ด้วย ethanol ให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.034, 0.017, 0.0085, 0.00425, 0.002125 และ 0.0015625 mg/ml

1.3 การเตรียมสารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 350 mg/ml

- ชั่ง sodium carbonate 17.5 g ใน volumetric flask 50 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่น

2. การทดสอบหาปริมาณ Total phenolic compounds

แบ่งชุดการทดสอบเป็น 3 ชุด (ชุด A, B และ C) โดยเตรียมสารเรียงตามลำดับ ดังนี้

ชุด A (test sample) ความเข้มข้นละ 3 หลุม

test sample 1 ml	} ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 3 นาที
Folin-Ciocalteu reagent 1 ml	
sodium carbonate 1 ml	
น้ำกลั่น 7 ml	

ชุด B (blank of test sample) ความเข้มข้นละ 3 หลุม

test sample 1 ml
น้ำกลั่น 9 ml

ชุด C (control) plate ละ 3 หลุม

ethanol 1 ml	} ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 3 นาที
Folin-Ciocalteu reagent 1 ml	
sodium carbonate 1 ml	
น้ำกลั่น 7 ml	

- ผสมสารละลายแต่ละชุดให้เข้ากันแล้ว เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที
- pipet สารละลายในแต่ละชุด (A, B และ C) ลงใน microtiter 96-well plate หลุมละ 200 μl (ทำ triplicate) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

3. การคำนวณหาปริมาณ Total phenolic compounds

- สร้าง standard curve ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นเพื่อใช้เป็น Gallic acid equivalent (GAE)
- เทียบหาค่า Total phenolic compounds ของสารสกัดแต่ละชนิดจาก Calibration curve โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปแทนค่าในสมการเส้นตรง

4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC และการตรวจสอบความเชื่อมั่นและความถูกต้องของวิธี

วิธีวิเคราะห์ที่จะพัฒนาขึ้นเพื่อทำการแยกสารสำคัญ 5 ตัวได้แก่ gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin ระบบจะเป็นแบบ Reverse-phase HPLC โดยใช้ column ชนิด

C18 และทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยการศึกษายปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการแยกของสารทั้ง 5 ตัว ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของ mobile phase, ความเข้มข้นของ buffer และ organic solvent ใน mobile phase เป็นต้น

เมื่อได้วิธีที่สามารถแยกสารทั้ง 5 ชนิดออกจากกันได้แล้วจะทำการตรวจสอบความเชื่อมั่นและความถูกต้องของวิธี (method validation) โดยจะทำการทดลองหา parameters ดังต่อไปนี้

- Precision (ความแม่นยำ)
- Accuracy (ความถูกต้อง)
- Linearity (สมการเส้นตรง)
- Limit of Detection (ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่วิธีนี้ตรวจสอบได้)
- Selectivity (ความจำเพาะของวิธี)

5 หาปริมาณสารโดยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้

นำสารสกัดดอกไม้ที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร gallic acid, catechin, ellagic acid, rutin และ quercetin เทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐานแต่ละตัว

5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard preparation)

สารมาตรฐาน gallic acid (GA), catechin (CA), rutin (RU), ellagic acid (EA) และ quercetin (QU) ถูกนำมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานละลายใน methanol (HPLC grade) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

Gallic acid มีความเข้มข้น 0.420 mg ml^{-1} , catechin = 0.434 mg ml^{-1} , rutin = 0.400 mg ml^{-1} , ellagic acid = 0.402 mg ml^{-1} และ quercetin = 0.402 mg ml^{-1} .

5.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างดอกไม้ (Flower sample preparation)

-ดอกไม้สดแต่ละชนิดถูกนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นนำไปบดเป็นผงละเอียด

-ชั่งผงละเอียดของดอกไม้แต่ละชนิด จำนวน 2 g แล้วเติม 95% ethanol 50 ml ทำการสกัดสารด้วยเครื่อง ultrasonic ที่ความถี่ 80 KHz อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วนำสารสกัดทั้ง 2 ครั้งรวมกัน กรองแล้วนำไปทำให้แห้งด้วย rotary evaporator ภายใต้สภาวะลดความดัน ที่อุณหภูมิ 50°C

-สารสกัดหยาบแห้งที่ได้นำมาละลายใน mobile phase 100 ml และก่อนฉีดสารสกัดเข้าเครื่อง HPLC (autosampler) ต้องกรองด้วย $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter (Millipore)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดและการทำ TLC fingerprint

จากการสกัดสารจากดอกไม้ 22 ชนิดด้วย ethanol ในอัตราส่วน 1:20 ด้วยวิธี Maceration โดยหมักครั้งแรกเป็นเวลา 7 วัน และครั้งที่สองเป็นเวลา 3 วัน แล้วรวมสารสกัดจากการหมักทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหย ethanol ออกให้ได้เป็นสารสกัดหยาบแห้ง พบว่า ได้ % yield ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง % yield ของสารสกัดหยาบที่ได้จากดอกไม้แต่ละชนิด

ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	% yield
ดอกกล้วยไม้หวาย	<i>Dendrobium Sonia.</i>	23.88
ดอกกุหลาบมอญ	<i>Rosa damascerna</i>	24.23
ดอกเก๊กฮวย	<i>Chrysanthemum indicum</i> Linn.	37.13
ดอกเข็มแดง	<i>Ixora Lobbii</i> Loud.	24.70
ดอกเข็มเหลือง	<i>Ascocentrum Minatum</i>	31.59
ดอกแคขาว	<i>Sesbania grandiflora</i> Desv.	38.41
ดอกแคแดง	<i>Sesbania grandiflora</i> Desv.	29.20
ดอกคำฝอย	<i>Carthamus tinctorius</i> Linn	20.11
ดอกจำปา	<i>Michelia champaca</i> Linn.	19.85
ดอกจำปี	<i>Michelia alba</i> DC.	9.84
ดอกชบา	<i>Hibicus rosa-sinensis</i> Linn.	26.63
ดอกช้องนาง	<i>Thunbergia repens</i> Linn.	26.25
ดอกดาวกระจาย	<i>Cosmos spp.</i>	31.80
ดอกบัวหลวง	<i>Nelumbo nucifera</i>	14.85
ดอกบานบุรี	<i>Allamanda cathartica</i> L.	43.03
ดอกบานไม่รู้โรย	<i>Limonium sinuafum</i>	6.92

ตารางที่ 1 แสดง % yield ของสารสกัดหยาบที่ได้จากดอกไม้แต่ละชนิด (ต่อ)

ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	% yield
ดอกพวงชมพู	<i>Antigonon leptopus</i> Hook. & Arn	42.50
ดอกแพงพวยขาว	<i>Catharanthus roseus</i>	41.42
ดอกแพงพวยม่วง	<i>Catharanthus roseus</i>	43.89
ดอกรำเพย	<i>Thevetia peruviana</i>	43.43
ดอกหางนกยูงไทย	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	23.81
ดอกอัญชัน	<i>Clitoria ternatea</i> Linn	24.95

ดอกไม้ที่มี % yield ของสารสกัดหยาบมากที่สุด 5 อันดับแรกได้แก่ ดอกแพงพวยม่วง รำเพย บานบุรี พวงชมพู และแพงพวยขาว ตามลำดับ ส่วนดอกไม้ที่มี % yield ของสารสกัดหยาบ น้อยที่สุดคือ ดอกบานไม่รู้โรย

การศึกษาลักษณะ TLC finger print

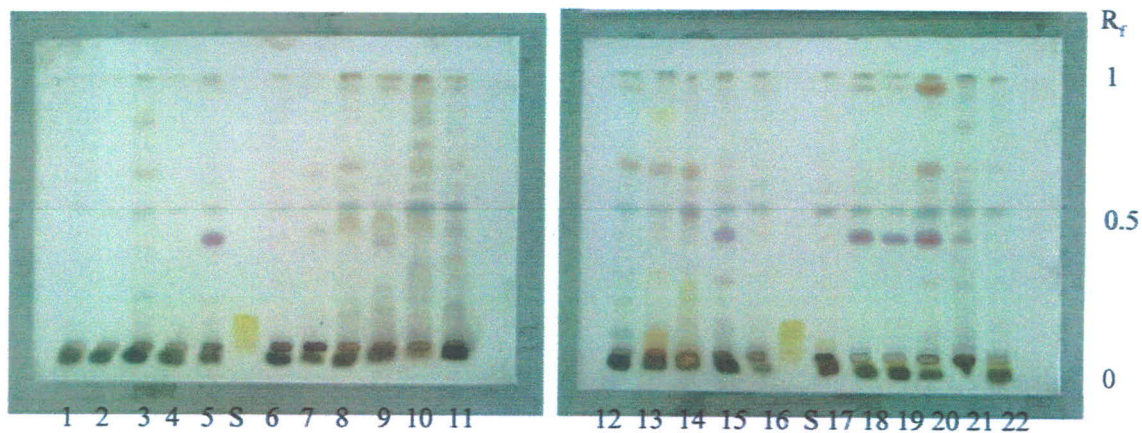
การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) เป็นการตรวจสอบในเบื้องต้น เพื่อคุณลักษณะการเกิด band ต่าง ๆ ของสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด โดยได้คัดเลือก solvent system (mobile phase) ที่เหมาะสม 2 system ได้แก่

1. Toluene:Ethyl acetate (8:2)
2. Hexane:Ethyl acetate (8:3)

หลังจากทำการ develop สารสกัดแต่ละชนิดบนแผ่น TLC แล้วได้ทำการศึกษาหาลักษณะการเกิด band และสารสำคัญที่ออกฤทธิ์โดยใช้ spray reagent 2 ชนิดคือ 10% H₂SO₄ และ 0.5% DPPH in ethanol ตามลำดับ

ตำแหน่งของสารสกัดจากดอกไม้แต่ละชนิดบนแผ่น TLC เป็นดังนี้

Plate A	Plate B
ตำแหน่งที่ 1 คือ ดอกกล้วยไม้หวาย	ตำแหน่งที่ 12 คือ ดอกช้องนาง
ตำแหน่งที่ 2 คือ ดอกกุหลาบมอญ	ตำแหน่งที่ 13 คือ ดอกดาวกระจาย
ตำแหน่งที่ 3 คือ ดอกเก๊กฮวย	ตำแหน่งที่ 14 คือ ดอกบัวหลวง
ตำแหน่งที่ 4 คือ ดอกเข็มแดง	ตำแหน่งที่ 15 คือ ดอกบานบุรี
ตำแหน่งที่ 5 คือ ดอกเข็มเหลือง	ตำแหน่งที่ 16 คือ ดอกบานไม่รู้โรย
ตำแหน่งที่ 6 คือ ดอกแคขาว	ตำแหน่งที่ 17 คือ ดอกพวงชมพู
ตำแหน่งที่ 7 คือ ดอกแคแดง	ตำแหน่งที่ 18 คือ ดอกแพงพวยขาว
ตำแหน่งที่ 8 คือ ดอกคำฝอย	ตำแหน่งที่ 19 คือ ดอกแพงพวยม่วง
ตำแหน่งที่ 9 คือ ดอกจำปา	ตำแหน่งที่ 20 คือ ดอกรำเพย
ตำแหน่งที่ 10 คือ ดอกจำปี	ตำแหน่งที่ 21 คือ ดอกหางนกยูงไทย
ตำแหน่งที่ 11 คือ ดอกชบา	ตำแหน่งที่ 22 คือ ดอกอัญชัน
ตำแหน่ง S คือ Standard (quercetin)	ตำแหน่ง S คือ Standard (quercetin)

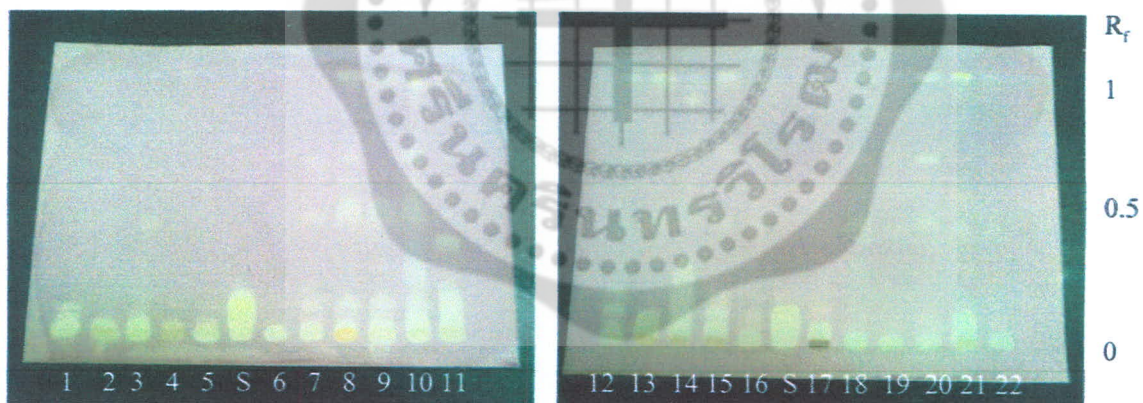


รูปที่ 7 TLC plate แสดง finger print ของดอกไม้ 22 ชนิด

Solvent system : Toluene:Ethyl acetate (8:2)

Adsorbent : Silica gel 60 F₂₅₄

Detector : 10% H₂SO₄ in ethanol

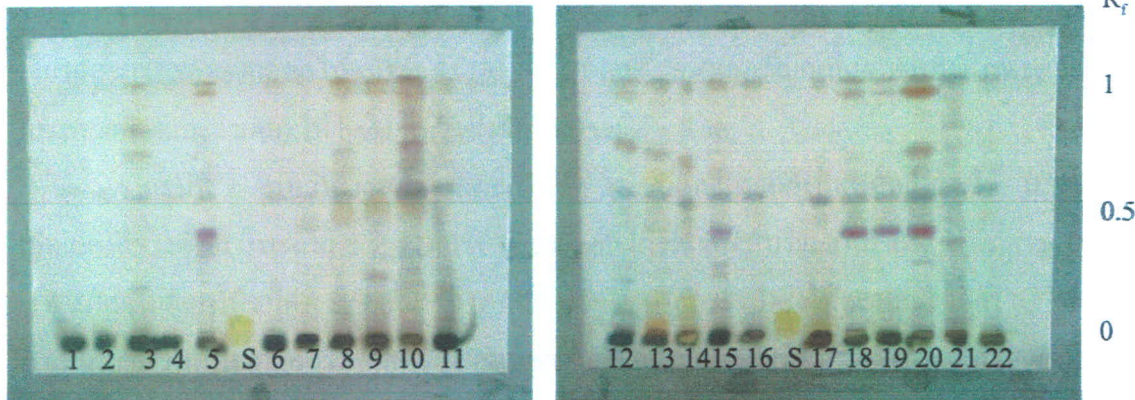


รูปที่ 8 TLC plate แสดง finger print ของดอกไม้ 22 ชนิด

Solvent system : Toluene:Ethyl acetate (8:2)

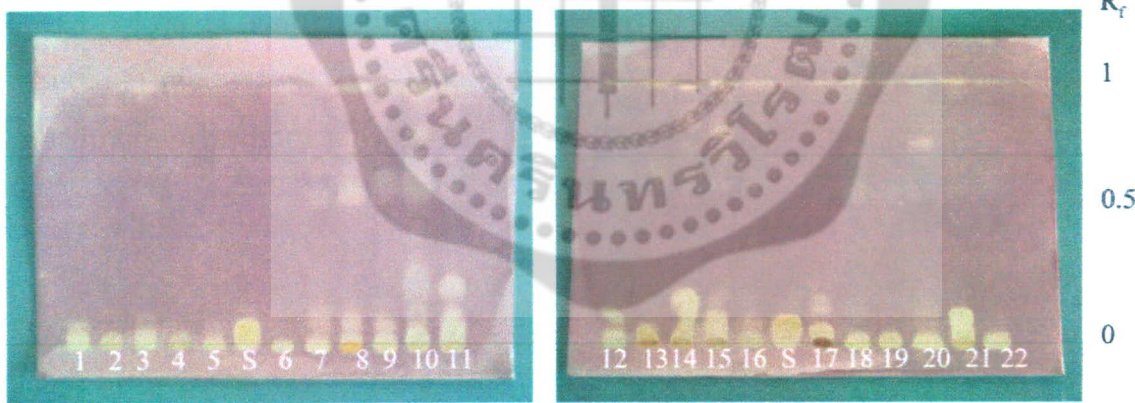
Adsorbent : Silica gel 60 F₂₅₄

Detector : 0.5% DPPH in ethanol



รูปที่ 9 TLC plate แสดง finger print ของดอกไม้ 22 ชนิด

Solvent system : Hexane:Ethyl acetate (8:3)
 Adsorbent : Silica gel 60 F₂₅₄
 Detector : 10% H₂SO₄ in ethanol



รูปที่ 10 TLC plate แสดง finger print ของดอกไม้ 22 ชนิด

Solvent system : Hexane:Ethyl acetate (8:3)
 Adsorbent : Silica gel 60 F₂₅₄
 Detector : 0.5% DPPH in ethanol

จากรูปที่ 7 พบว่าสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด มีค่า R_f value = 0.43 ให้ band สีน้ำเงินเขียวและสารสกัดจากดอกไม้ชนิดที่ 5, 15, 18, 19 และ 20 (ดอกเข็มเหลือง บานบุรี แพงพวยขาว แพงพวยม่วงและรำเพย) ให้ band สีม่วงซึ่งมีค่า R_f value = 0.40

จากรูปที่ 8 พบว่าสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากเกิดแถบสีขาวยกกับสารละลาย 0.5% DPPH in ethanol ได้ชัดเจนในบริเวณที่ทำการ spot สาร โดยที่สารสกัดจากดอกไม้ชนิดที่ 8, 9 และ 10 (ดอกคำฝอย จำปาและจำปี)ซึ่งให้แถบสีขาวยมีค่า R_f value = 0.45 และสารสกัดจากดอกไม้ชนิดที่ 11 (ดอกชบา) ให้แถบสีขาวซึ่งมีค่า R_f value = 0.33 ที่ชัดเจนกว่าสารสกัดจากดอกไม้ชนิดอื่นในตำแหน่งเดียวกัน

จากรูปที่ 9 พบว่าสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิดให้ band สีน้ำเงินเขียวซึ่งมีค่า R_f value = 0.53 และสารสกัดจากดอกไม้ชนิดที่ 5, 15, 18, 19 และ 20 (ดอกเข็มเหลือง บานบุรี แพงพวยขาว แพงพวยม่วงและรำเพย) ให้ band สีม่วงซึ่งมีค่า R_f value = 0.40

จากรูปที่ 10 พบว่าสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากเกิดแถบสีขาวยกกับสารละลาย 0.5% DPPH in ethanol ได้ชัดเจนในบริเวณที่ทำการ spot สาร โดยที่สารสกัดจากดอกไม้ชนิดที่ 11 (ดอกชบา) ให้แถบสีขาวซึ่งมีค่า R_f value = 0.21 สารสกัดจากดอกไม้ชนิดที่ 14 (ดอกบัวหลวง) ให้แถบสีขาวซึ่งมีค่า R_f value = 0.15 และสารสกัดจากดอกไม้ชนิดที่ 21 (ดอกหางนกยูงไทย) ให้แถบสีขาวซึ่งมีค่า R_f value = 0.10 ที่ชัดเจนกว่าสารสกัดจากดอกไม้ชนิดอื่นในตำแหน่งเดียวกัน

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการตรวจวัดเชิงปริมาณ

ก. DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เป็นการตรวจวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (ที่ 520 nm) ที่ลดลงของสารละลาย DPPH หลังจากเติมสารสกัดจากดอกไม้ และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 520 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
BHA	250×10^{-3}	0.2260	79.70	0.12
	125×10^{-3}	0.5345	52.00	
	62.50×10^{-3}	0.8140	26.90	
	31.25×10^{-3}	0.9645	13.38	
	15.63×10^{-3}	1.0285	7.63	
trolox	26×10^{-3}	0.1555	83.67	0.01
	13×10^{-3}	0.3975	58.27	
	6.5×10^{-3}	0.5920	37.85	
	3.25×10^{-3}	0.7160	24.83	
	1.63×10^{-3}	0.7640	19.79	
vitamin C	12.50×10^{-3}	0.0520	95.33	0.0068
	6.25×10^{-3}	0.6095	45.26	
	3.13×10^{-3}	0.8740	24.24	
	1.56×10^{-3}	1.0150	8.85	
	0.78×10^{-3}	1.0770	3.28	

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 520 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกกล้วยไม้หวาย	1	0.5700	35.37	> 1
	0.5	0.7650	13.27	
	0.25	0.8410	4.65	
	0.125	0.8990	-1.93	
	0.0625	0.9030	-2.38	
ดอกกุหลาบมอญ	1	0.0505	95.46	0.10
	0.5	0.0525	95.28	
	0.25	0.0810	92.72	
	0.125	0.3775	66.08	
	0.0625	0.8120	27.04	
ดอกแก้วฮวย	1	0.2195	80.28	0.56
	0.5	0.5715	48.65	
	0.25	0.8755	21.34	
	0.125	1.0785	3.10	
	0.0625	1.1410	-2.52	
ดอกเข็มแดง	1	0.0645	94.20	0.31
	0.5	0.2825	74.62	
	0.25	0.5750	48.34	
	0.125	0.9220	17.16	
	0.0625	1.0020	9.97	
ดอกเข็มเหลือง	1	0.3240	74.32	0.62
	0.5	0.7030	44.27	
	0.25	0.9385	25.60	
	0.125	1.0700	15.18	
	0.0625	1.1115	11.89	

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 520 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกแคขาว	1	1.0165	14.67	> 1
	0.5	1.2475	1.11	
	0.25	1.2600	0.12	
	0.125	1.3580	-7.65	
	0.0625	1.5165	-20.21	
ดอกแสดแดง	1	0.8310	34.13	> 1
	0.5	0.9735	22.83	
	0.25	1.0375	17.76	
	0.125	1.2370	1.94	
	0.0625	1.3845	-9.75	
ดอกคำฝอย	1	0.8845	21.52	> 1
	0.5	1.0505	6.79	
	0.25	1.1270	0	
	0.125	1.1690	-3.73	
	0.0625	1.1935	-5.90	
ดอกจำปา	1	0.0880	92.19	0.23
	0.5	0.2685	76.18	
	0.25	0.7195	36.16	
	0.125	0.9745	13.53	
	0.0625	1.1420	-1.33	
ดอกจำปี	1	0.1130	89.97	0.47
	0.5	0.5400	52.09	
	0.25	0.9580	15.00	
	0.125	1.0975	2.62	
	0.0625	1.1430	-1.42	

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 520 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกชบา	1	0.3335	75.53	0.67
	0.5	0.8490	37.71	
	0.25	1.1115	18.45	
	0.125	1.2675	7.00	
	0.0625	1.3230	2.93	
ดอกช้องนาง	1	0.8900	34.70	> 1
	0.5	1.1365	16.62	
	0.25	1.2570	7.78	
	0.125	1.3720	-0.66	
	0.0625	1.3975	-2.53	
ดอกดาวกระจาย	1	0.1015	92.55	0.28
	0.5	0.3740	72.56	
	0.25	0.8445	38.04	
	0.125	1.1350	16.73	
	0.0625	1.2730	6.60	
ดอกบัวหลวง	1	0.0780	94.08	0.30
	0.5	0.3410	74.10	
	0.25	0.8105	38.44	
	0.125	1.0640	19.18	
	0.0625	1.2375	6.00	
ดอกบานบุรี	1	0.8835	32.89	> 1
	0.5	1.1275	14.36	
	0.25	1.2320	6.42	
	0.125	1.3080	0.65	
	0.0625	1.3485	-2.43	

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ต่อ)

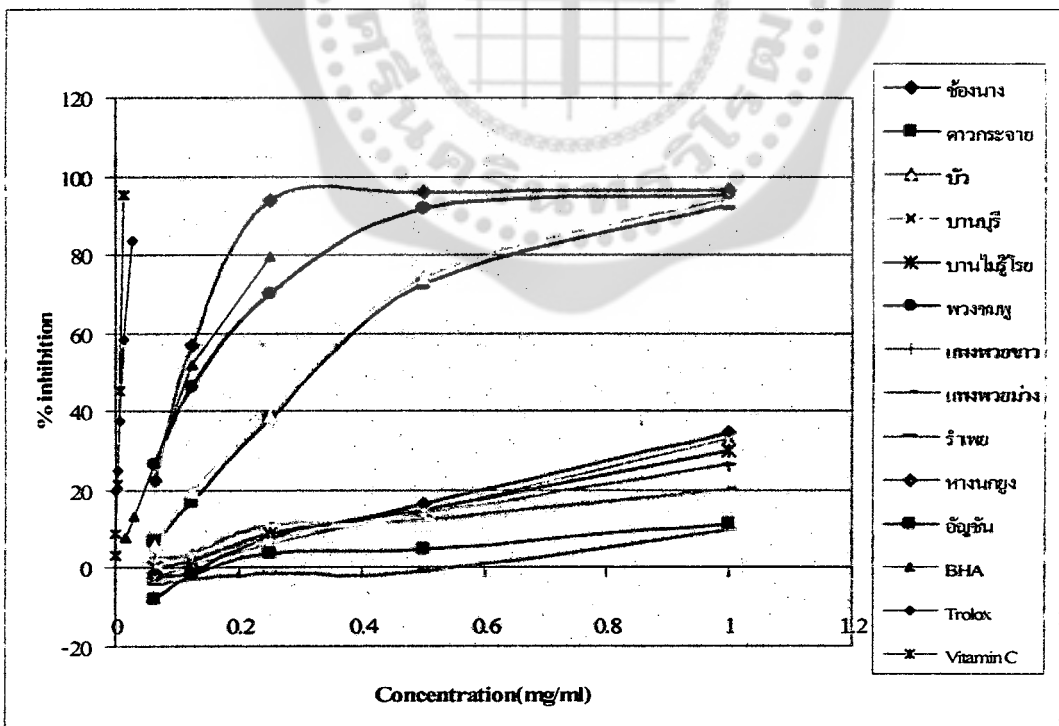
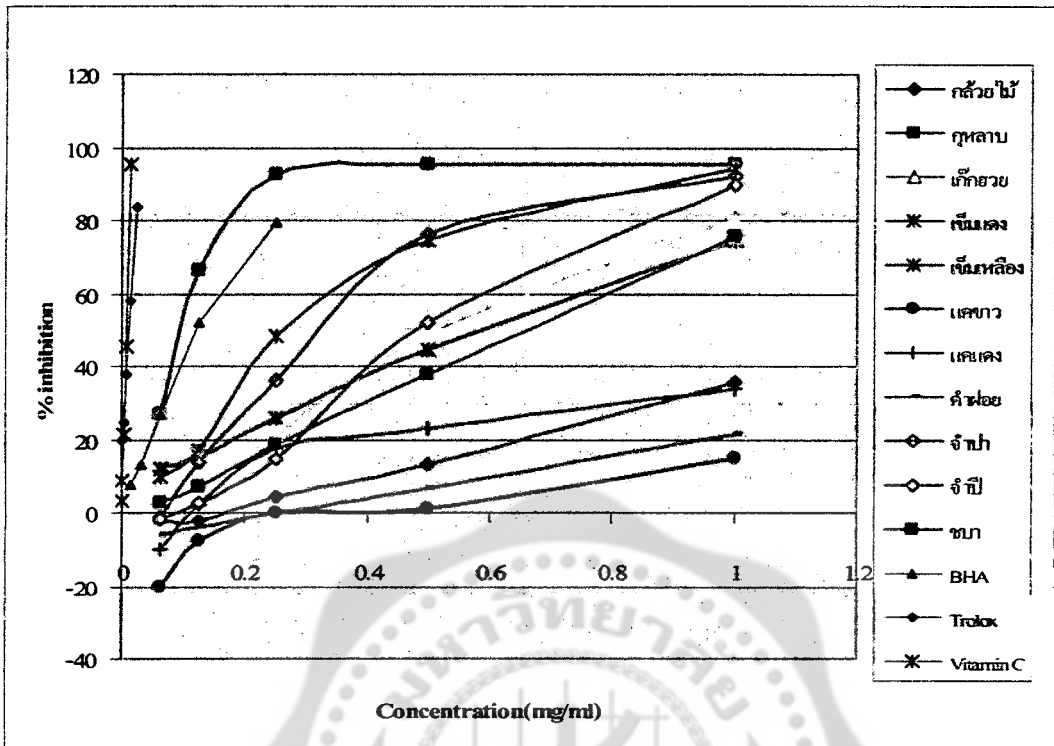
Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 520 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกบานไม่รู้โรย	1	0.9210	30.04	> 1
	0.5	1.1240	14.62	
	0.25	1.1995	8.89	
	0.125	1.2970	1.48	
	0.0625	1.3150	0.11	
ดอกพวงชมพู	1	0.0640	95.34	0.15
	0.5	0.1135	91.74	
	0.25	0.4120	70.02	
	0.125	0.7380	46.30	
	0.0625	1.0100	26.52	
ดอกแพงพวยขาว	1	1.0110	26.45	> 1
	0.5	1.1860	13.71	
	0.25	1.2750	7.24	
	0.125	1.3265	3.49	
	0.0625	1.3360	2.80	
ดอกแพงพวยม่วง	1	1.1025	19.79	> 1
	0.5	1.2055	12.30	
	0.25	1.2230	11.02	
	0.125	1.3240	3.67	
	0.0625	1.3725	0.15	
ดอก rá เพย	1	1.2120	9.62	> 1
	0.5	1.3495	-0.63	
	0.25	1.3570	-1.19	
	0.125	1.3760	-2.61	
	0.0625	1.3930	-3.88	

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 520 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกหางนกยูงไทย	1	0.0515	96.16	0.09
	0.5	0.0565	95.79	
	0.25	0.0865	93.55	
	0.125	0.5805	56.71	
	0.0625	1.0400	22.45	
ดอกอัญชัน	1	1.1860	11.56	> 1
	0.5	1.2740	5.00	
	0.25	1.2890	3.88	
	0.125	1.3620	-1.57	
	0.0625	1.4465	-7.87	

จากตาราง พบว่าสารสกัดจากดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ($IC_{50} = 0.09$ mg/ml) รองลงมาได้แก่ สารสกัดจากดอกกุหลาบมอญ ($IC_{50} = 0.10$ mg/ml) พวงชมพู ($IC_{50} = 0.15$ mg/ml) จำปา ($IC_{50} = 0.23$ mg/ml) ดาวกระจาย ($IC_{50} = 0.28$ mg/ml) บัวหลวง ($IC_{50} = 0.30$ mg/ml) เข็มแดง ($IC_{50} = 0.31$ mg/ml) จำปี ($IC_{50} = 0.47$ mg/ml) เก๊กฮวย ($IC_{50} = 0.56$ mg/ml) เข็มเหลือง ($IC_{50} = 0.62$ mg/ml) และชบา ($IC_{50} = 0.67$ mg/ml) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากดอกไม้ที่เหลือมีค่า $IC_{50} > 1$ mg/ml โดยที่สารสกัดจากดอกตำบามีฤทธิ์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า % Inhibition ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.62 ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) และความเข้มข้น (Concentration) ในหน่วย mg/ml สำหรับหาค่า IC_{50} แสดงดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (BHA, trolox และ vitamin C) โดยวิธี DPPH radical scavenging method

ข. ABTS cation radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay เป็นการตรวจวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (ที่ 734 nm) ที่ลดลงของสารละลาย ABTS หลังจากเติมสารสกัดจากดอกไม้ และเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แสดงผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (trolox) ด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 734 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
trolox	0.05	0.0955	78.20	0.03
	0.025	0.2375	45.78	
	0.0125	0.3165	27.74	
	0.00625	0.3540	19.18	
	0.00313	0.3765	14.04	
ดอกกล้วยไม้หวาย	1	0.2785	35.68	> 1
	0.5	0.3390	21.71	
	0.25	0.3670	15.24	
	0.125	0.3865	10.74	
	0.0625	0.3945	8.89	
ดอกกุหลาบมอญ	1	0.0940	78.99	0.56
	0.5	0.2250	49.72	
	0.25	0.3225	27.93	
	0.125	0.3645	18.55	
	0.0625	0.3855	13.85	

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (trolox) ด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 734 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกเก๊กฮวย	1	0.2680	38.11	> 1
	0.5	0.3260	24.71	
	0.25	0.3710	14.32	
	0.125	0.3830	11.55	
	0.0625	0.3900	9.93	
ดอกเข็มแดง	1	0.1404	67.55	0.68
	0.5	0.2575	40.53	
	0.25	0.3110	28.18	
	0.125	0.3675	15.13	
	0.0625	0.3890	10.16	
ดอกเข็มเหลือง	1	0.2615	38.69	> 1
	0.5	0.3155	26.03	
	0.25	0.3600	15.59	
	0.125	0.3685	13.60	
	0.0625	0.3805	10.79	
ดอกแคขาว	1	0.3635	14.77	> 1
	0.5	0.3805	10.79	
	0.25	0.3900	8.56	
	0.125	0.3985	6.57	
	0.0625	0.3990	6.45	
ดอกแคแดง	1	0.3215	24.62	> 1
	0.5	0.3500	17.94	
	0.25	0.3745	12.19	
	0.125	0.3850	9.73	
	0.0625	0.3930	7.85	

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (trolox) ด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 734 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกคำฝอย	1	0.2810	33.57	> 1
	0.5	0.3330	21.28	
	0.25	0.3585	15.25	
	0.125	0.3765	10.99	
	0.0625	0.3870	8.51	
ดอกจำปา	1	0.1375	67.49	0.69
	0.5	0.2510	40.66	
	0.25	0.3270	22.70	
	0.125	0.3590	15.13	
	0.0625	0.3790	10.40	
ดอกจำปี	1	0.2180	48.10	> 1
	0.5	0.3060	27.14	
	0.25	0.3355	20.12	
	0.125	0.3735	11.07	
	0.0625	0.3830	8.81	
ดอกชบา	1	0.2325	45.04	> 1
	0.5	0.3055	27.78	
	0.25	0.3455	18.32	
	0.125	0.2730	11.82	
	0.0625	0.3845	9.10	
ดอกช้องนาง	1	0.2940	30.00	> 1
	0.5	0.3520	16.19	
	0.25	0.3685	12.26	
	0.125	0.3860	8.10	
	0.0625	0.3930	6.43	

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (trolox) ด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 734 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกดาวกระจาย	1	0.1060	75.35	0.62
	0.5	0.2455	42.91	
	0.25	0.3180	26.05	
	0.125	0.3625	15.70	
	0.0625	0.3875	9.88	
ดอกบัวหลวง	1	0.1385	68.38	0.59
	0.5	0.2255	48.52	
	0.25	0.2795	36.19	
	0.125	0.3195	27.05	
	0.0625	0.3545	19.06	
ดอกบานบุรี	1	0.3050	29.07	> 1
	0.5	0.3400	20.93	
	0.25	0.3740	13.02	
	0.125	0.3920	8.84	
	0.0625	0.3995	7.09	
ดอกบานไม่รู้โรย	1	0.2855	33.60	> 1
	0.5	0.3360	21.86	
	0.25	0.3635	15.47	
	0.125	0.3885	9.65	
	0.0625	0.4005	6.86	
ดอกพวงชมพู	1	0.0050	98.84	0.24
	0.5	0.0840	80.58	
	0.25	0.2055	52.49	
	0.125	0.2845	34.22	
	0.0625	0.3410	21.16	

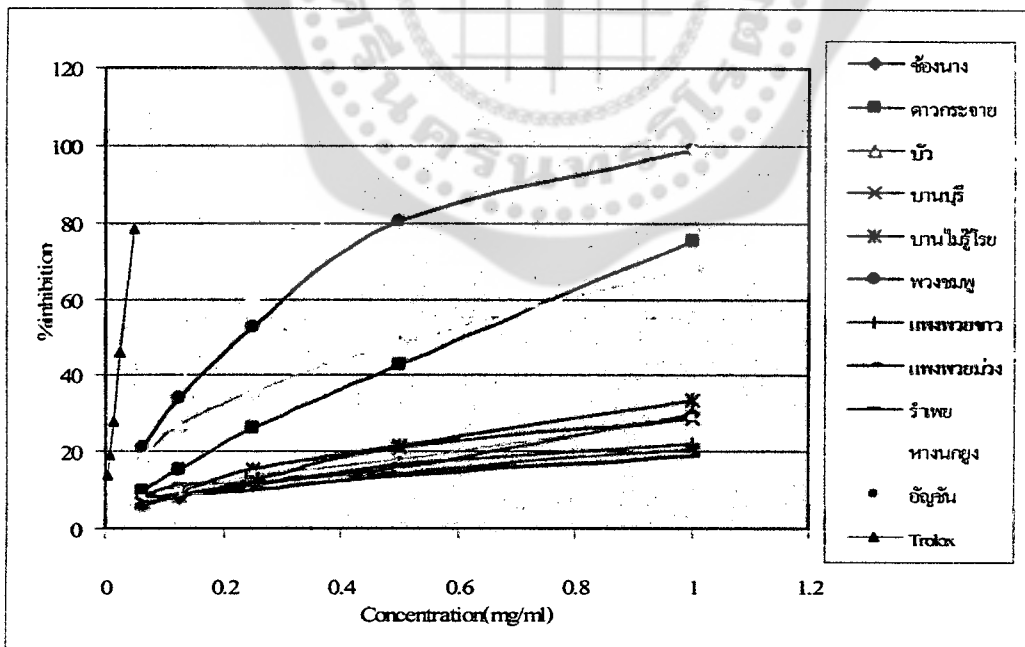
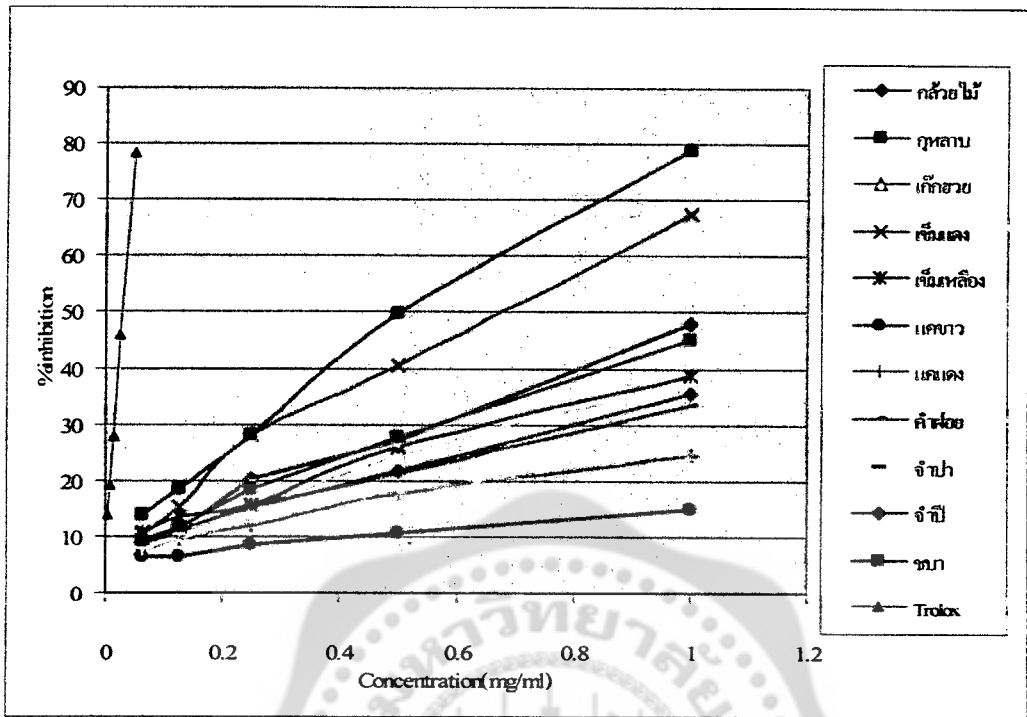
ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance), % Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน (trolox) ด้วยวิธี ABTS cation radical scavenging assay (ต่อ)

Sample	ความเข้มข้น (mg/ml)	Absorbance $\lambda = 734 \text{ nm}$	% Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
ดอกแพงพวยขาว	1	0.3375	21.97	> 1
	0.5	0.3585	17.11	
	0.25	0.3825	11.56	
	0.125	0.3925	9.25	
	0.0625	0.3965	8.32	
ดอกแพงพวยม่วง	1	0.3505	18.96	> 1
	0.5	0.3725	13.87	
	0.25	0.3885	10.17	
	0.125	0.3955	8.55	
	0.0625	0.3995	7.63	
ดอกรำแพน	1	0.3395	20.86	> 1
	0.5	0.3655	14.80	
	0.25	0.3750	12.59	
	0.125	0.3805	11.31	
	0.0625	0.3910	8.86	
ดอกหางนกยูงไทย	1	0.0050	98.81	0.22
	0.5	0.0315	92.50	
	0.25	0.1700	59.52	
	0.125	0.2590	38.33	
	0.0625	0.3165	24.64	
ดอกอัญชัน	1	0.3045	29.09	> 1
	0.5	0.3520	17.95	
	0.25	0.3685	14.10	
	0.125	0.3840	10.49	
	0.0625	0.3920	8.62	

จากตาราง พบว่าสารสกัดจากดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดใน (IC₅₀ = 0.22 mg/ml) รองลงมาได้แก่ สารสกัดจากดอกพวงชมพู (IC₅₀ = 0.24 mg/ml) กุหลาบมอญ (IC₅₀ = 0.56 mg/ml) บัวหลวง (IC₅₀ = 0.59 mg/ml) ดาวกระจาย (IC₅₀ = 0.62 mg/ml) เข็มแดง (IC₅₀ = 0.68 mg/ml) และจำปา (IC₅₀ = 0.69 mg/ml) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากดอกไม้ที่เหลือมีค่า IC₅₀ > 1 mg/ml โดยที่สารสกัดจากดอกแคขาวมีฤทธิ์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า % Inhibition ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.77 ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) และความเข้มข้น (Concentration) ในหน่วย mg/ml สำหรับหาค่า IC₅₀ แสดงดังรูปที่ 12





รูปที่ 12 กราฟแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดและสารมาตรฐาน โดยวิธี ABTS cation radical scavenging assay

3. การหาปริมาณ Total phenolic compounds

การหาปริมาณ Total phenolic compounds ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay ทำโดยการนำสารสกัดจากดอกไม้ผสมเข้ากับ Folin-Ciocalteu reagent และ sodium carbonate จากนั้น incubate ในที่มีดเป็นเวลา 90 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 nm เปรียบเทียบกับค่า Gallic acid equivalent (GAE) แสดงผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay

Sample	Absorbance $\lambda = 725 \text{ nm}$	Total phenolic Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g)
ดอกกล้วยไม้หวาย	0.5110	40.17
ดอกกุหลาบมอญ	> 1	-
ดอกเก๊กฮวย	0.4475	34.45
ดอกเข็มแดง	> 1	-
ดอกเข็มเหลือง	0.3365	24.45
ดอกแฉขาว	0.2360	15.40
ดอกแฉแดง	0.2620	17.74
ดอกคำฝอย	0.2585	17.43
ดอกจำปา	0.5950	47.73
ดอกจำปี	0.4840	37.73
ดอกชบา	0.5030	39.45
ดอกช้องนาง	0.2490	16.57
ดอกดาวกระจาย	> 1	-
ดอกบัวหลวง	> 1	-
ดอกบานบุรี	0.3005	21.21
ดอกบานไม่รู้โรย	0.3745	27.87
ดอกพวงชมพู	> 1	-

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay (ต่อ)

Sample	Absorbance $\lambda = 725 \text{ nm}$	Total phenolic Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g)
ดอกแพงพวยขาว	0.4225	32.20
ดอกแพงพวยม่วง	0.3320	24.05
ดอกรำแพน	0.2030	12.43
ดอกหางนกยูงไทย	> 1	-
ดอกอัญชัน	0.3335	24.18

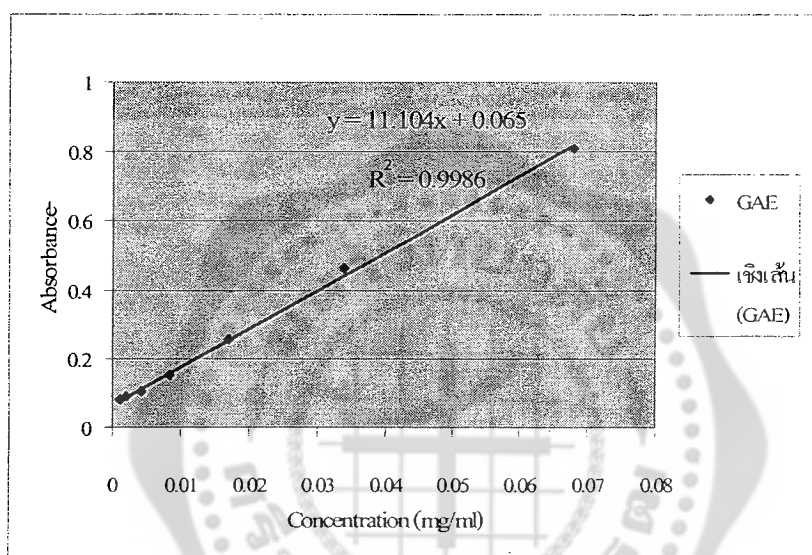
เนื่องจากสารสกัดจากดอกไม้บางชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงที่มากเกินไป จึงทำการเจือจางสารสกัดก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อไป แสดงผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดจากดอกไม้ 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay

Sample	Absorbance $\lambda = 725 \text{ nm}$	Total phenolic Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g)
ดอกกุหลาบมอญ	0.3585	105.70
ดอกเข็มแดง	0.2130	53.30
ดอกดาวกระจาย	0.2365	61.80
ดอกบัวหลวง	0.3935	106.10
ดอกพวงชมพู	0.4755	147.90
ดอกหางนกยูงไทย	0.2420	63.80

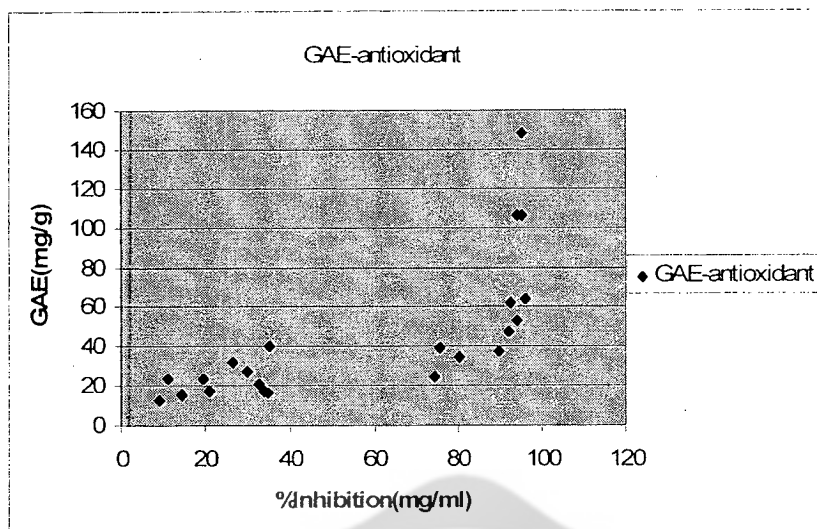
จากตาราง พบว่าสารสกัดจากดอกพวงชมพูมีปริมาณ Total phenolic compounds มากที่สุด รองลงมาได้แก่ สารสกัดจากดอกบัวหลวง กุหลาบ หางนกยูง ดาวกระจาย และเข็มแดง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากดอกกร้าเพมีปริมาณ Total phenolic compounds น้อยที่สุด

Standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของ Gallic acid ที่ใช้ในการหาปริมาณ Total phenolic compounds ของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิด แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 กราฟแสดง Standard curve ของ Gallic acid

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE กับ % Inhibition ของสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด พบว่าสารสกัดจากดอกไม้ที่มีปริมาณ Total phenolic compounds มากจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง แสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า GAE และ % Inhibition ของสารสกัด

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ HPLC และการตรวจสอบความเชื่อมั่นและความถูกต้องของวิธี

4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard preparation)

สารมาตรฐาน gallic acid (GA), catechin (CA), rutin (RU), ellagic acid (EA) และ quercetin (QU) ถูกนำมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานละลายใน methanol (HPLC grade) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

Gallic acid มีความเข้มข้น 0.420 mg ml^{-1} , catechin = 0.434 mg ml^{-1} , rutin = 0.400 mg ml^{-1} , ellagic acid = 0.402 mg ml^{-1} และ quercetin = 0.402 mg ml^{-1} .

4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างดอกไม้ (Flower sample preparation)

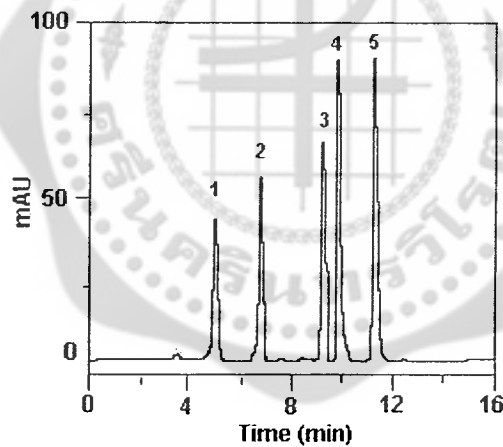
-ดอกไม้สดแต่ละชนิดถูกนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นนำไปบดเป็นผงละเอียด

-ชั่งผงละเอียดของดอกไม้แต่ละชนิด จำนวน 2 g แล้วเติม 95% ethanol 50 ml ทำการสกัดสารด้วยเครื่อง ultrasonic ที่ความถี่ 80 KHz อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วนำสารสกัดทั้ง 2 ครั้งรวมกัน กรองแล้วนำไปทำให้แห้งด้วย rotary evaporator ภายใต้อากาศลดความดัน ที่อุณหภูมิ 50°C

-สารสกัดหยาบแห้งที่ได้นำมาละลายใน mobile phase 100 ml และก่อนฉีดสารสกัดเข้าเครื่อง HPLC (autosampler) ต้องกรองด้วย $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter (Millipore)

4.3 สภาวะการวิเคราะห์ HPLC

ทำการเตรียมสารละลายผสมของสารทั้ง 5 ตัวโดยบีบเปิดสารละลายมาตรฐานดังข้อ 4.1 มาใส่รวมกันใน volumetric flask แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย methanol เนื่องจากสารฟีนอลิกทั้ง 5 มีขั้ว (polar molecule) จึงเริ่มต้นใช้ mobile phase ที่มีส่วนประกอบของ methanol-น้ำ หรือ acetonitrile-น้ำ ที่อัตราส่วนต่างๆกัน และเป็นแบบระบบ isocratic พบว่าไม่มีอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ทำให้การแยกกันของพีคทั้ง 5 สมบูรณ์ พบว่าการเติมกรดลงไปเล็กน้อยใน mobile phase ทำให้พีค GA, CA และ QU เกิดการแยกกันอย่างสมบูรณ์ ยกเว้นพีคของ RU และ EA จากนั้นได้ปรับเปลี่ยนเป็นระบบ gradient โดยมี solvent A (water:acetic acid, 25:1) และ solvent B (methanol) ทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ solvent A และ solvent B เพื่อหาสภาวะที่สามารถแยกพีคทั้ง 5 ออกจากกันอย่างสมบูรณ์ พบว่า การเพิ่ม % ของ solvent B เป็น 50 % ภายใน 4 นาทีและขึ้น 80% ภายใน 10 นาทีที่ความเร็ว (flow rate) 1.0 ml/min สามารถแยกพีคทั้งหมดได้ภายใน 15 นาที ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของการแยกสารฟีนอลิกทั้ง 5 ตัว; 1. GA ($t_r = 5.0$ min), 2. CA ($t_r = 6.8$ min), 3. rutin ($t_r = 9.2$ min), 4. EA ($t_r = 9.9$ min), 5. QU ($t_r = 11.3$ min) โดยใช้ระบบ gradient และ UV detection ที่ 280 nm

4.4 การตรวจสอบความเชื่อมั่นและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ที่ได้จากข้อ 4.3 นำมาตรวจสอบความเชื่อมั่นและความถูกต้อง (validation) ด้วยการหา สมการเส้นตรง (linearity) ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่วิธีนี้ตรวจสอบได้ (limit of detection)) ความแม่นยำของวิธี (precision) และค่าความถูกต้อง (accuracy)

การหาสมการเส้นตรงทำโดยนำสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 จากข้อ 4.1 มาเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเจือจางในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม 5 ความเข้มข้น แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC แต่ละความเข้มข้นฉีด 3 ครั้ง หาความสัมพันธ์สมการเส้นตรงระหว่าง ความเข้มข้นของสารทั้ง 5 กับพื้นที่ใต้พีค (peak area) เฉลี่ย พบว่าสมการเส้นตรงที่ได้มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง มีค่า correlation coefficients (r^2) เท่ากับหรือมากกว่า 0.9994 และสมการเส้นตรงของแต่ละสารแสดงอยู่ในตารางที่ 7

ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่วิธีนี้ตรวจสอบได้ทำโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานของสารทั้ง 5 ลงเรื่อยๆ จนกระทั่งได้ค่า พื้นที่ใต้กราฟต่อสัญญาณรบกวน เท่ากับ 3 (signal/noise = 3) (ตารางที่ 7) พบว่าสารทั้ง 5 มีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ตรวจสอบได้ อยู่ระหว่าง 0.3709 -1.3191 $\mu\text{g ml}^{-1}$

ตารางที่ 6 แสดงค่าความสัมพันธ์สมการเส้นตรง (Linear regression equation) correlation coefficient และ detection limit ของสาร

Compound	Regression equation (n=5)	Correlation coefficient (r^2)	Linearity range ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Detection limit ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
GA	$y = 24440(\pm 189)x - 201.73(\pm 33.8)$	0.9994	2.625 - 21.0	0.3709
CA	$y = 6544.8(\pm 47)x - 57.76(\pm 11.39)$	0.9999	10.85 - 86.8	1.3191
RU	$y = 8295.9(\pm 71)x + 121.99(\pm 36.47)$	0.9997	10.0 - 80.0	0.9757
EA	$y = 15329(\pm 246)x - 245.43(\pm 40.07)$	0.9995	10.05 - 80.4	0.5999
QU	$y = 13868(\pm 133)x + 182.21(\pm 31.41)$	0.9999	10.05 - 80.4	0.5706

ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดและสูงที่สุดของสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานทั้ง 5 คำนวณมาฉีดซ้ำ 5 ครั้งเพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธีในแต่ละวัน (Intra-day precision) และยังคงตรวจสอบติดต่อกัน 5 วัน (Inter-day precision) นำค่าพื้นที่ใต้กราฟและเวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ที่ได้จากการฉีดซ้ำ 5 ครั้งของแต่ละสารและแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยและ %RSD แสดงผลใน

ตารางที่ 7 พบว่า %RSD ของพื้นที่ใต้กราฟและเวลามีค่า < 2% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่มีความแม่นยำยอมรับได้ของวิธี HPLC

ตารางที่ 7 แสดงค่าความแม่นยำ ทั้ง Intra-day Precision (n=5) และ Inter-day precision (n = 5 days)

Compound	Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Peak area (% R.S.D.)	Retention time (% R.S.D.)	Peak area (% R.S.D.)	Retention time (% R.S.D.)
GA	2.62	1.11	0.38	1.20	0.41
	21.00	0.99	0.31	1.13	0.34
CA	10.85	1.15	0.42	1.18	0.40
	86.80	0.67	0.31	1.06	0.32
RU	10.00	1.01	0.47	1.25	0.43
	80.00	0.98	0.28	1.23	0.32
EA	10.05	1.65	0.31	1.75	0.35
	80.40	1.03	0.34	1.66	0.36
QU	10.05	1.31	0.29	1.65	0.34
	80.40	0.92	0.36	1.15	0.33

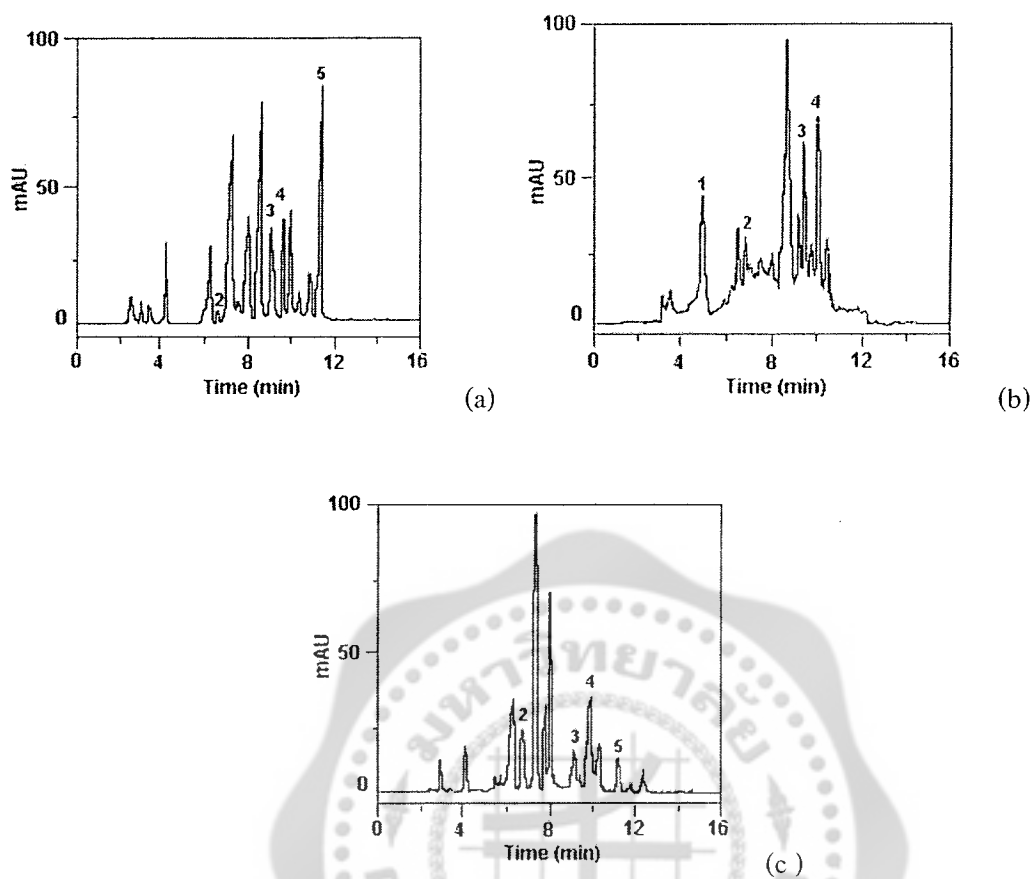
ความถูกต้องของวิธีตรวจสอบโดยการเติมสารละลายมาตรฐานฟีนอลิกทั้ง 5 ที่ทราบความเข้มข้น (20 และ $60 \mu\text{g ml}^{-1}$) ลงในสารสกัดของดอกไม้ 3 ชนิด (Spike method) ได้แก่ สารสกัดดอกจำปี (*M. alba*), สารสกัดดอกหางนกยูงไทย (*C. pulcherrima*) และสารสกัดดอกบัวหลวง (*N. nucifera*) แล้วนำมาวิเคราะห์หา % recovery พบว่าค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 96.34-102.56% (ตารางที่ 8) แสดงว่าวิธี HPLC นี้มีความถูกต้องยอมรับได้

ตาราง 8 แสดงค่า %Recoveries ของสารฟีนอลิกทั้ง 5 (n=5) ที่ได้จากการ spike สารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงในสารสกัดดอกไม้ 3 ชนิด

Compound (amount added ($\mu\text{g ml}^{-1}$))	จำปี		หางนกยูงไทย		บัวหลวง	
	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
GA (20)	98.56	1.35	101.32	1.42	98.84	1.05
(60)	99.70	1.11	102.56	1.36	99.13	0.98
CA (20)	96.94	1.58	98.03	1.26	100.68	1.35
(60)	98.05	1.49	99.62	1.24	100.19	1.22
RU (20)	98.06	1.03	96.87	1.53	97.51	1.60
(60)	98.90	1.18	97.25	1.58	99.69	1.25
EA (20)	97.75	1.68	96.34	1.72	98.42	1.28
(60)	99.15	1.22	97.08	1.36	98.17	1.08
QU (20)	99.64	1.38	100.73	1.09	99.29	1.76
(60)	99.41	1.07	99.65	1.02	98.76	1.30

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้ง 5 ในสารสกัดดอกไม้

สารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิดที่ได้จากการเตรียมสารละลายตัวอย่างดอกไม้ (Flower sample preparation) ในข้อ 4.2 นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการ HPLC ดังกล่าวข้างต้น โครมาโตแกรมตัวอย่างของสารสกัดดอกไม้ 3 ชนิดแสดงอยู่ในรูปที่ 16 นำพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสารที่พบมาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นกับสมการเส้นตรงของสารนั้นๆ (ตารางที่ 9)



รูปที่ 16 HPLC chromatograms ของสารสกัด (a) ดอกจำปี (*M. alba*), (b) ดอกหางนกยูงไทย (*C. pulcherrima*) และ (c) บัวหลวง (*N. nucifera*): Peaks: 1, gallic acid ($t_R = 5.0$ min); 2, catechin ($t_R = 6.8$ min); 3, rutin ($t_R = 9.2$ min); 4, ellagic acid ($t_R = 9.9$ min) and 5, quercetin ($t_R = 11.3$ min)

ตารางที่ 9 แสดงค่าปริมาณของสารฟีนอลิกทั้ง 5 ในสารสกัดดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด

Sample	GA (mg/g)	CA (mg/g)	RU (mg/g)	EA (mg/g)	QU (mg/g)
ดอกกล้วยไม้หวาย	-	-	3.14	1.24	-
ดอกกุหลาบมอญ	1.44	-	2.16	-	-
ดอกแก้วชวย	-	-	-	2.83	0.53
ดอกเข็มแดง	-	1.61	-	-	-
ดอกเข็มเหลือง	-	0.82	0.66	-	-
ดอกแคขาว	-	-	-	-	-
ดอกแคแดง	-	-	1.49	1.42	-
ดอกคำฝอย	-	-	-	-	2.00
ดอกจำปา	0.76	-	2.67	-	1.88
ดอกจำปี	-	0.62	3.18	1.44	3.05
ดอกชบา	-	-	-	3.55	-
ดอกช้องนาง	0.16	0.52	0.44	-	-
ดอกดาวกระจาย	-	-	-	1.13	3.88
ดอกบัวหลวง	-	7.03	4.89	5.18	0.68
ดอกบานบุรี	-	-	5.98	-	1.29
ดอกบานไม่รู้โรย	-	-	1.98	0.67	0.62
ดอกพวงชมพู	-	11.86	-	11.85	-
ดอกแพงพวยขาว	-	-	-	2.47	-
ดอกแพงพวยม่วง	-	-	-	3.56	-
ดอกรำเพย	-	-	-	-	-
ดอกหางนกยูงไทย	2.07	3.69	6.21	3.63	-
ดอกอัญชัน	-	1.75	-	-	-

หมายเหตุ สารฟีนอลิกที่แสดงอยู่ในหน่วย mg/g ของ crude extract

- หมายถึงไม่สามารถตรวจวัดได้

จากตารางข้างต้น พบว่าดอกพวงชมพูมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด (CA = 11.86 mg/g และ EA = 11.85 mg/g โดยรวม = 23.71 mg/g) รองลงมาได้แก่ ดอกบัวหลวง (CA= 7.03, RU= 4.89, EA= 5.18, QU=0.68 mg/g, โดยรวม = 17.78 mg/g) และ ดอกหางนกยูงไทย (GA= 2.07, CA= 3.69, RU= 6.21, EA= 3.63 mg/g และ โดยรวม 15.60 mg/g) ส่วนดอกไม้ชนิดอื่นมีสารฟีนอลิกโดยรวม อยู่ต่ำกว่า 10 mg/g จากโครมาโตแกรมรูปที่ 16 พบว่ายังมีพีคของสารอื่นๆ นอกจากสารฟีนอลิกทั้ง 5 ซึ่งบางพีคมีพื้นที่ใต้กราฟมากกว่าพีคที่สารฟีนอลิกที่ผู้วิจัยสนใจ



บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการทดลองทำ TLC finger print โดยใช้ solvent system เป็น Toluene:Ethyl acetate (8:2) และ Hexane:Ethyl acetate (8:3) และ spray ด้วย 10% H_2SO_4 พบว่าในสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิด จะมี band ที่ชัดเจนที่ตำแหน่ง R_f value = 0.43 และ 0.53 ตามลำดับ ซึ่งเป็น major compounds และเมื่อเปรียบเทียบกับ การ spray ด้วย 0.5% DPPH in ethanol พบว่าสารสกัดจากดอกไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี เช่น ดอกคำฝอย จำปา และจำปี จะมี band เด่นชัดที่ตำแหน่ง R_f value = 0.45 โดยเกิดเป็นแถบสีขาวซึ่งแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยตำแหน่งนั้นน่าจะเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์และเป็น minor compounds จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยการ spray 0.5% DPPH in ethanol พบว่า TLC finger print ของดอกไม้ที่เกิดแถบสีขาวมาก จะให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay ที่ดีเช่นกัน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการทำ TLC finger print ของดอกไม้ สามารถบ่งบอกว่าดอกไม้เหล่านั้นอยู่ในวงศ์เดียวกัน เช่น ดอกบานบุรี แพงพวยขาว แพงพวยม่วงและรำเพย (วงศ์ Apocynaceae) จะให้ band สีม่วงซึ่งมีค่า R_f value = 0.40 แสดงว่าตำแหน่งนั้นน่าจะมีสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน หรือสารตัวเดียวกัน ที่มีความเป็นขั้วเล็กน้อย

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกไม้ 22 ชนิดด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay พบว่า สีของสารสกัดจากดอกไม้ไม่มีผลรบกวนค่าการวิเคราะห์เนื่องจากการทดลองใช้สารสกัดเป็น blank และส่วนใหญ่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยวิธี ABTS cation radical scavenging assay มีข้อดีกว่าเนื่องจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนอกช่วง visible light ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงถูกรบกวนน้อยกว่า ส่วนวิธี DPPH radical scavenging assay มีข้อดีตรงที่มี sensitivity มากกว่า โดยทั้งสองวิธีมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระคล้ายคลึงกันคือสารสกัดจากดอกไม้ที่มีฤทธิ์จะให้โปรตอนเพื่อทำให้ DPPH และ ABTS+ เสถียร โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เป็น free radical ไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็น free radical จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากดอกหางนกยูงมีฤทธิ์ดีที่สุดทั้งวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay

สารสกัดจากดอกไม้ที่มีปริมาณ Total phenolic compounds มาก เช่น ดอกพวงชมพู และบัว จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจาก phenolic compounds ในธรรมชาติ เช่น flavonoids และ tannins เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงพบว่าผลการทดลองสอดคล้องกันไปในทางบวกทั้งวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay ในขณะที่สารสกัดจาก

ดอกเข็มแดง และหางนกยูงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงแต่กลับมีปริมาณ Total phenolic compounds น้อย เนื่องจากสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์ อาจมีโครงสร้างอื่นที่ไม่ใช่ phenolic compounds ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากดอกไม้ที่มีปริมาณ Total phenolic compounds มาก น่าจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงตามไปด้วย แต่ในทางกลับกันสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่จำเป็นต้องมีปริมาณ Total phenolic compounds มาก

สำหรับผลการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้ง 5 ตัว ด้วยวิธี HPLC พบว่าดอกพวงชมพูมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด (CA = 11.86 mg/g และ EA = 11.85 mg/g โดยรวม = 23.71 mg/g) รองลงมาได้แก่ ดอกบัวหลวง (CA= 7.03, RU= 4.89, EA= 5.18, QU=0.68 mg/g, โดยรวม = 17.78 mg/g) และดอกหางนกยูงไทย (GA= 2.07, CA= 3.69, RU= 6.21, EA= 3.63 mg/g และ โดยรวม 15.60 mg/g) ส่วนดอกไม้ชนิดอื่นมีสารฟีนอลิกโดยรวม อยู่ต่ำกว่า 10 mg/g ซึ่งสอดคล้องกับผลของการหาปริมาณ Total phenolic compounds แต่เมื่อนำไปเทียบกับฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ของสารสกัด จะพบว่าดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์มากเป็นอันดับ 1 ตามด้วยดอกพวงชมพูและดอกบัวหลวง อาจเป็นไปได้ว่า ในสารสกัดดอกหางนกยูงไทยอาจมีสารอื่นที่มีฤทธิ์ในการเป็น antioxidant นอกจากสารฟีนอลิกทั้ง 5 ที่ทำการศึกษาอยู่

บทที่ 6

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

ข้อสรุป

1. การเตรียมสารสกัด

ดอกไม้ที่ให้ % yield ของสารสกัดหยาบมากที่สุด ได้แก่ ดอกแพงพวยม่วง มีค่าเท่ากับ 43.89% ส่วนดอกไม้ที่ให้ % yield ของสารสกัดหยาบน้อยที่สุดคือ ดอกบานไม่รู้โรย มีค่าเท่ากับ 6.92%

2. การทำ TLC finger print

การใช้ 10% H_2SO_4 เป็น detector เพื่อคุณลักษณะการเกิด band ของสารสกัดจากดอกไม้แต่ละชนิด ซึ่งสามารถบ่งบอกถึง pattern ของสารสกัดจากดอกไม้ นั้น ๆ และเมื่อใช้ 0.5% DPPH in ethanol เป็น detector เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น พบว่าสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณส่วนล่างของ plate แสดงว่าสารนั้นเป็นสารที่มีขั้ว โดยเกิดแถบสีขาวยุ่ที่มีความเข้มต่างกันไปตามตำแหน่งที่เกิดแถบสีขาวนั้นน่าจะเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็น minor compounds

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการตรวจวัดเชิงปริมาณ

ผลการทดสอบเป็นไปในทางเดียวกันทั้งวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS cation radical scavenging assay โดยที่สารสกัดจากดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ดีที่สุดในทั้งสองวิธี

4. การหาปริมาณ Total phenolic compounds

ปริมาณ Total phenolic compounds มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดที่มีปริมาณ Total phenolic compounds มากจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วย โดยสารสกัดจากดอกพวงชมพูมีปริมาณ Total phenolic compounds มากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 147.90 mg/g

5. การหาปริมาณสารฟีนอลิกโดยวิธี HPLC

วิธีวิเคราะห์ HPLC ที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำและความถูกต้องยอมรับได้ สามารถนำมาใช้หาปริมาณสารฟีนอลิก อันได้แก่ gallic acid, catechin, rutin, ellagic acid และ quercetin ในสารสกัดดอกไม้ได้ พบว่าดอกไม้ทั้ง 22 ชนิดมีสารฟีนอลิกทั้งชนิดของสารและปริมาณสารไม่เหมือนกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ที่มี polarity ต่าง ๆ กันในการสกัดสารจากดอกไม้ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มี polarity ต่าง ๆ กันมาทดสอบฤทธิ์
2. จากผลของการวิจัยทำให้ทราบว่า ควรนำสารสกัดจากดอกพวงชมพู ดอกบัวหลวงและดอกหางนกยูงไทยไปทำการศึกษาพัฒนาในการทำเป็นเครื่องสำอางในการต้านริ้วรอย เนื่องจากให้ ปริมาณสารฟีนอลิกสูงที่สุดจากดอกไม้ทั้ง 22 ชนิดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง



เอกสารอ้างอิง

1. ฉัฐวรรณ ชัยสุชาทิพย์ และวัชรวิ พันธุ์สุรเวทย์, การทดสอบประสิทธิภาพตำรับครีมไหม้ชะลอความแก่ (โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต), กรุงเทพฯ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2546.
2. อุทัยวรรณ นพเก้า และลินดา ประทุมทอง, การศึกษาลักษณะทางโครมาโตกราฟีของสารสกัดจากพืชจำพวกมะระและคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของสารสกัด (โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต), กรุงเทพฯ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2546.
3. Matthaus, B., Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds, *J. Agricultural Food & Chemistry*, 50(2002) 3444-3452
4. Yamazaki, K., Hasshimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drug, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42(1994) 1663-1665
5. Tan Tze Guan, Matthew Whiteman, Antioxidant Activities of Some Tropical Fruits, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National University of Singapore, 2002
6. พิมพ์ร ตีลาพรพิสิฐ, เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง ฉบับปรับปรุง, เชียงใหม่, ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544.
7. พรณวิภา กฤษภาพงษ์ และคณะ, เทคโนโลยีการพัฒนาคำรับเครื่องสำอางและการผลิตชั้นอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2543.
8. กมลภัทร์ สวัสดิ์โกศล และชมพูนุช แสงศักดิ์, การพัฒนาผลิตภัณฑ์ลดความหมองคล้ำของสีผิวจากสารสกัดขอย, (โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต), กรุงเทพฯ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2544.
9. เต็ม สมิตินันท์, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม, บ.ประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ, 2544
10. Richard J. P. Cannell, *Natural Products Isolation*, Human Press Inc., America, (1998) 234-

ภาคผนวก



ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ
Thai Pharmaceutical and
Health Science Journal

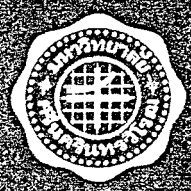
ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม - สิงหาคม 2550

Vol. 2 No. 2 May - August 2007

ศรินครินทร์วิโรภเภสัชสาร ปีที่ 12

การวิชาการของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

1905-3460



Simultaneous Determination of Gallic acid, Catechin, Rutin, Ellagic Acid and Quercetin in Flower Extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Nelumbo nucifera* by HPLC

Weerasak Samee* and Suwanna Vorarat

Natural Product Evaluation Center (NPEC), Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok 26120, Thailand

* Corresponding author: E-mail address: weerasak@swu.ac.th

ABSTRACT

Gallic acid (GA), catechin (CA), rutin (RU), ellagic acid (EA) and quercetin (QU) were analyzed simultaneously by HPLC with UV detection at 280 nm. The separation was carried out by Luna C18 reverse phase column (\varnothing 4.6 x 250 mm) packed with 5 μ m diameter particles. Solvent gradients were performed by dual pumping system, and varied the proportion of solvent A [water-acetic acid (25:1, v/v)] to solvent B (methanol). Solvent B was increased to 80% in 10 min at a flow rate of 1.0 mL/min. Calibration curves were found to be linear with ranges of 2.62 - 21.00, 10.65 - 86.80, 10.00 - 80.00, 10.05 - 80.40 and 10.05 - 80.40 μ g.mL⁻¹ for GA, CA, RU, EA and QU respectively. The correlation coefficients of linear regression analysis and detection limits were 0.9994 - 0.9999 and 0.3709 - 1.3191 μ g.mL⁻¹ respectively. The contents of GA, CA, RU, EA and QU in the flower extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Nelumbo nucifera* were successfully determined at 5.0, 6.8, 9.2, 9.8 and 11.3 min respectively with satisfactory reproducibility and recovery.

Thai Pharm Health Sci J 2007;2(2):131-137[§]

Introduction

Gallic acid (GA), catechin (CA), rutin (RU), ellagic acid (EA) and quercetin (QU) are phenolic compounds. Structurally they have phenolic groups which serve as a source of readily available hydrogen atoms such that the subsequent radicals produced can be delocalized over the phenolic structure (Figure 1).^{1,2} The interest in these compounds is due to their pharmacological activity as radical scavengers.^{3,4} They have been proved to have potential preventive and therapeutic effects in many diseases, where the oxidative stress has been implicated, including cardiovascular diseases, cancer, neurodegenerative disorders and in aging.⁵⁻⁹ The phenolics are also of interest in food, cosmetic and pharmaceutical industries, as substitutes for synthetic antioxidants. These five phenolics widely distribute in the plant kingdom.¹⁰⁻¹² Several chromatographic methods have been documented for determination of GA, CA, RU, EA and QU in plants¹³⁻¹⁸ but none on simultaneous determination of these five phenolics in flowers by HPLC method. In this study, HPLC with UV detector was developed for simultaneous determination of GA, CA, RU, EA and QU in the flower extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Nelumbo nucifera*. The assay was validated to determine linearity, precision, recovery, selectivity and stability.

[§] 12th year of Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science

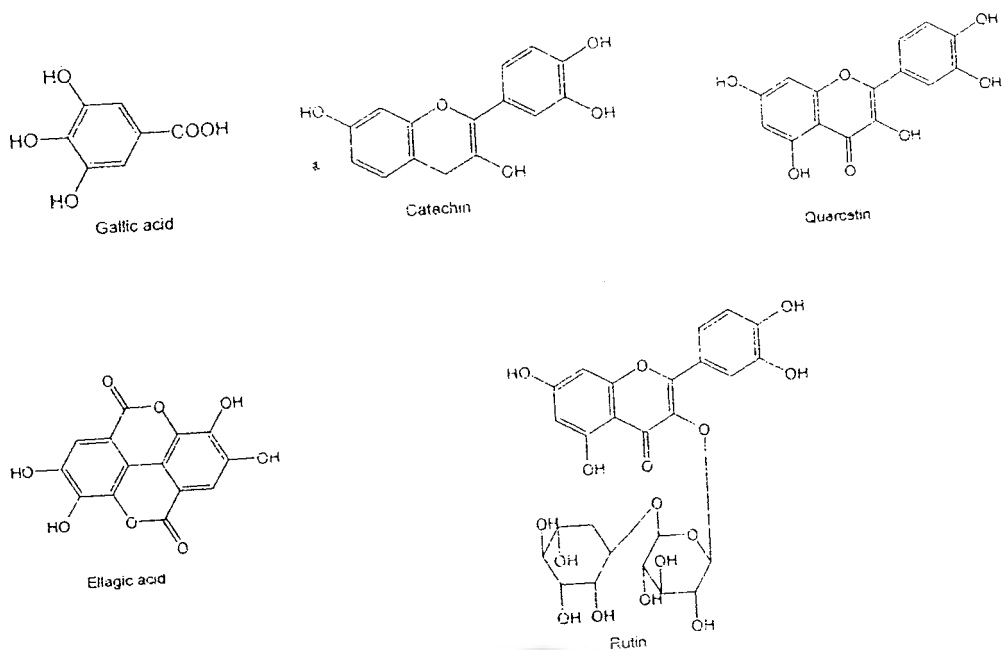


Figure 1 Chemical structures of gallic acid (GA), catechin (CA), rutin (RU), ellagic acid (EA) and quercetin (QU)

Materials and Methods

Reagents

GA was purchased from Sigma (MO, USA). CA, EA, RU and QU from Fluka (Steinheim, Germany). Acetic acid, ethanol and methanol (HPLC grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

0.434, 0.400, 0.402 and 0.402 mg.mL⁻¹ for GA, CA, RU, EA and QU respectively. All standard solutions were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore), and injected by autosampler.

Sample preparation

Apparatus

Chromatographic analysis was carried out by Luna C18 reverse-phase column (Ø 4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. HPLC system (Thermo separation product (TSP), U.S.A.) was combined with a dual pump (SpectraSYSTEM P1500), a UV detector (SpectraSYSTEM UV1000) and an autosampler (SpectraSYSTEM AS3000). Chromatograms were analyzed with the TSP PC1000 software.

The fresh flowers of *M. alba*, *C. pulcherrima* and *N. nucifera* were washed and dried at 60 °C. Then, dried flowers were ground to fine powder. The extraction was carried out using 2 g of powdered flowers with 50 mL of 95% ethanol under 80 KHz, 45 °C in ultrasonic extraction device for 30 min, repeated twice. The extract was collected and filtered; the filtrate was dried at 50 °C under reduced pressure in a rotary evaporator. The dried crude extract was dissolved in the 100 mL mobile phase. After filtering through a filter paper and a 0.45 µm membrane filter (Millipore), the extract was injected into HPLC by autosampler.

Standard preparation

Standard stock solutions of five phenolic compounds were prepared in methanol, at concentrations of 0.420,

Results and Discussions

Optimization of chromatographic conditions

The five phenolic compounds, GA, CA, RU, EA and QU, are polar molecules. In the beginning, various proportions of either methanol-water or acetonitrile-water system were used as mobile phases but separation was not satisfactory. The presence of acid in a mobile phase system gave a much better separation for GA, CA, RU, EA and QU except it could not separate baseline RU and EA. The gradient elution of solvent A [water-acetic acid (25:1 v/v)] and solvent B (methanol) had a significant effect on the resolution of compounds. As a result, solvent gradients were formed, using dual pumping system, by varying the proportion of solvent A [water-acetic acid (25:1, v/v)] to solvent B (methanol). Solvent B was increased to 50% in 4 min and subsequently increased to 80% in 10 min at a flow rate of 1.0 mL/min. Detection wavelength was 280 nm.

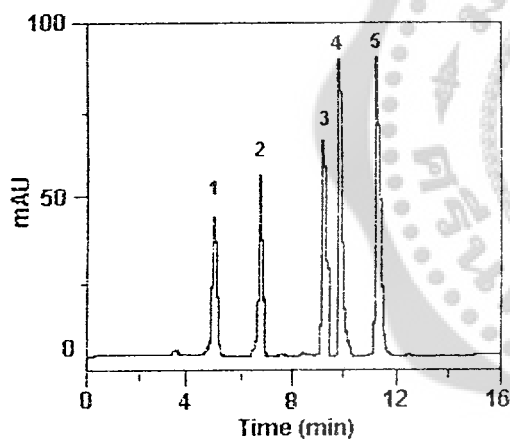


Figure 2 Chromatographic profile using gradient elution.

The peaks correspond to five reference standard phenolic compounds: 1 = gallic acid ($t_R = 5.0$ min); 2 = catechin ($t_R = 6.8$ min); 3 = rutin ($t_R = 9.2$ min); 4 = ellagic acid ($t_R = 9.9$ min) and 5 = quercetin ($t_R = 11.3$ min) measured at 280 nm.

It can be seen from Figure 2 that a good separation can be achieved within 15 min using the condition described. Symmetrical, sharp and well-resolved peaks were observed for GA, CA, RU, EA and QU. The elution order and the retention times for GA, CA, RU, EA and QU were 5.0, 6.8, 9.2, 9.9 and 11.3 min respectively. The proposed method was validated regarding recovery, linearity, detection limit, precision, selectivity and stability.

Linearity, precision and detection limit

A series of the standard mixture solutions of these five phenolic compounds were tested to determine the linearity between the standard mixture concentrations and peak areas. The standard response curve for each phenolic was a linear regression fitted to triplicate values obtained at each of five concentrations (2.62 – 21, 10.85 – 86.80, 10 – 80, 10.05 – 80.40 and 10.05 – 80.40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for GA, CA, RU, EA and QU respectively). The linearity relationship between peak areas and concentrations was good and the correlation coefficients (r^2) were greater than 0.9994 for all curves.

The results of regression analysis on calibration curves and detection limits are presented in Table 1. The detection limits of five phenolic compounds were between 0.3709 and 1.3191 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ evaluated on the basis of a signal-to-noise ratio of 3 (S/N = 3).

Standard mixture solutions of two concentrations, at high and low concentrations, were injected five times to determine the reproducibility of the peak areas and retention times under the optimum conditions. Intra-day and inter-day relative standard deviations (R.S.D.) for retention time and peak areas are considerably low (Table 2) indicating that the precision is good. Stability of crude extract was tested every 24 h for 7 days, and was found to be rather stable throughout the 7-day period (R.S.D. < 2.0%).

Table 1 Validation data from calibration curves of five phenolic compounds

Compound	Regression equation (n = 5)	Correlation coefficient (r^2)	Linearity range ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Detection limit ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
GA	$y = 24440(\pm 189)x - 201.73(\pm 33.8)$	0.9994	2.625 - 21.0	0.3709
CA	$y = 6544.8(\pm 47)x - 57.76(\pm 11.39)$	0.9999	10.35 - 86.8	1.3191
RU	$y = 8295.9(\pm 71)x + 121.99(\pm 36.47)$	0.9997	10.0 - 80.0	0.9757
EA	$y = 15329(\pm 246)x - 245.43(\pm 40.07)$	0.9995	10.05 - 80.4	0.5999
QU	$y = 13868(\pm 133)x + 182.21(\pm 31.41)$	0.9999	10.05 - 80.4	0.5706

Table 2 Precision of standard solutions at low and high concentrations (n = 5)

Compound	Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Peak area (% R.S.D.)	Retention time (% R.S.D.)	Peak area (% R.S.D.)	Retention time (% R.S.D.)
GA	2.62	1.11	0.38	1.20	0.41
	21.00	0.99	0.31	1.13	0.34
CA	10.35	1.15	0.42	1.18	0.40
	86.80	0.67	0.31	1.06	0.32
RU	10.00	1.01	0.47	1.25	0.43
	80.00	0.98	0.28	1.23	0.32
EA	10.05	1.65	0.31	1.75	0.35
	80.40	1.03	0.34	1.66	0.36
QU	10.05	1.31	0.29	1.65	0.34
	80.40	0.92	0.36	1.15	0.33

Sample analysis and recovery

The ethanol extracts of *M. alba*, *C. pulcherrima* and *N. nucifera* flowers were analysed under the proposed conditions. The chromatographic separations of GA, CA, RU, EA and QU in ethanol extracts of these flowers are shown in Figures 3(a) - (c). The content of each phenolic compound was calculated from the corresponding calibration curve and presented as the mean of five determinations as shown in Table 3. It was found that *M. alba* and *N. nucifera* flower extracts contained CA, RU, EA and QU, while *C. pulcherrima*

flower extract contained GA, CA, RU and EA.

The recovery experiments of the five phenolic compounds were performed by adding GA, CA, RU, EA and QU standard solutions (20 and 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) to the flower extracts, which were treated according to the procedure described in sample preparation section for five times. The recovery of the five phenolic compounds was between 96.34 and 102.56% (see Table 4).

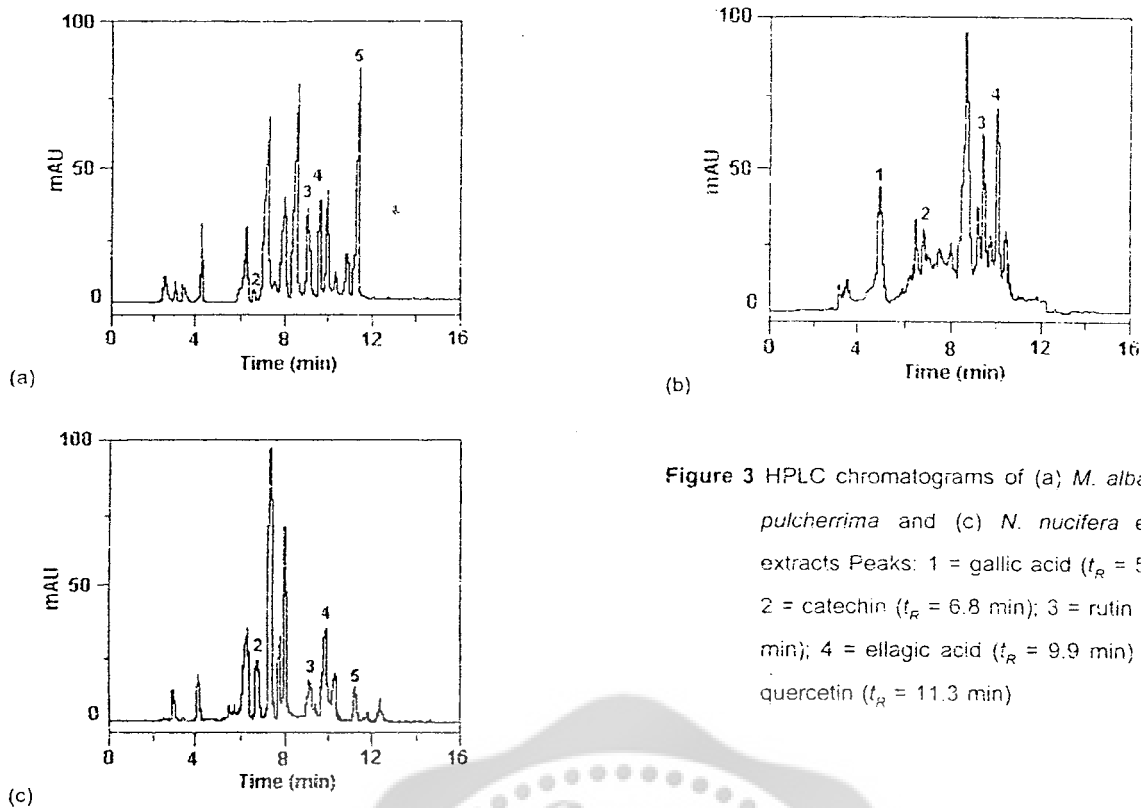


Figure 3 HPLC chromatograms of (a) *M. alba*, (b) *C. pulcherrima* and (c) *N. nucifera* ethanolic extracts. Peaks: 1 = gallic acid ($t_R = 5.0$ min), 2 = catechin ($t_R = 6.8$ min); 3 = rutin ($t_R = 9.2$ min); 4 = ellagic acid ($t_R = 9.9$ min) and 5 = quercetin ($t_R = 11.3$ min)

Table 3 Contents of five phenolic compounds in the extract of flowers (n=5)

Compound	<i>M. alba</i>		<i>C. pulcherrima</i>		<i>N. nucifera</i>	
	Content (mg.g ⁻¹)	% R.S.D.	Content (mg.g ⁻¹)	% R.S.D.	Content (mg.g ⁻¹)	% R.S.D.
GA	ND ^a	^b	2.07	1.81	ND ^d	^e
CA	0.62	2.12	3.69	1.44	7.03	1.50
RU	3.18	1.70	6.21	2.14	4.89	1.79
EA	1.44	2.07	3.63	2.30	5.18	1.97
QU	3.05	1.33	ND ^a	^b	0.68	1.61

^a ND = not detected, ^b not applicable.

Table 4 Recoveries of the five phenolic compounds in the flower extracts (n=5)

Compound	Amount added (µg.mL ⁻¹)	<i>M. alba</i>		<i>C. pulcherrima</i>		<i>N. nucifera</i>	
		Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
GA	20	98.56	1.35	101.32	1.42	98.84	1.05
	60	99.70	1.11	102.56	1.36	99.13	0.98
CA	20	96.94	1.58	98.03	1.26	100.68	1.35
	60	98.05	1.49	99.62	1.24	100.19	1.22
RU	20	98.06	1.03	96.87	1.53	97.51	1.60
	60	98.90	1.16	97.25	1.58	99.69	1.25
EA	20	97.75	1.68	96.34	1.72	98.42	1.28
	60	99.15	1.22	97.08	1.36	98.17	1.08
QU	20	99.64	1.38	100.73	1.39	99.29	1.76
	60	99.41	1.07	99.65	1.02	98.76	1.30

Conclusions

A new HPLC method to simultaneously analyze gallic acid, catechin, rutin, ellagic acid and quercetin has been developed and validated for stability, linearity, accuracy and precision. This HPLC procedure provided excellent identification and quantification of these five phenolic compounds presented in *M. alba*, *C. pulcherrima* and *N. nucifera* flowers with a short analysis time (15 min). The experimental results indicated that *C. pulcherrima* flower extract contained an especially high concentration of gallic acid (2.07 mg.g⁻¹ dry weight). It was also shown that catechin, rutin and ellagic acid were detected in all flower extracts and *M. alba* flower contained highest amount of quercetin (3.05 mg.g⁻¹ dry weight). Since the phenolic compounds have been of interest of health benefits, the present analytical study could be a potential application to identify and quantify the phenolic compounds in other flower extracts.

Acknowledgements

This work was supported by Srinakharinwirot University research fund. The authors would like to thank the Natural Product Evaluation Center (NPEC), Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University for providing research facilities.

References

1. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 1999;66:401-436.
2. Nikolic KM. Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. *J Mol Struct: THEOCHEM* 2006;774(1-3):95-105.
3. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology – terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 2004;558: 3-6.
4. Baydar NG, Özkan G, Yaşar S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control* 2007;18(9):1131-1136.
5. Wu LC, Hsu HW, Chen YC, Chiu CC, Lin YI, Ho JAA. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem* 2006;95:319-327.
6. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nu. Res Rev* 2000;13:79-106.
7. Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordström Ö, Blomhuff R, Moskaung JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. *Free Rad Biol Med* 2002;32:386-393
8. Sun AY, Chen YM. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *J Biomed Sci* 1996;5:401-414.
9. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;341: 454-457.
10. Justesen U, Knuthsen P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem* 2001;73: 245-250.
11. Soong YY, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem* 2004;88:411-417.
12. Rizzo M, Ventrice D, Varone MA, Sidari R, Carini A. HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. *J Pharm Biomed Anal* 2006;42:46-55.
13. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000;891:163-183.
14. Siriwoharn T, Wrolstad RE. Polyphenolic composition of marion and evergreen blackberries. *J Food Sci* 2004;69: 233-240.
15. Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:714-719.
16. Soong YY, Barlow PJ. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chem* 2006;97:524-530.
17. Proestos C, Sereli D, Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and

18. Yang XR, Ye CX, Xu JK, Jiang YM. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia*

