สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารจากดอกดาวเรืองในประเทศไทย

Antioxidation Activity of Compounds from the Flower of *Tagetes erecta* Linn in Thailand

นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง

b 12784314
i

สขทม.
เลขทะเบียน 142898
วัน.เดือน.ปี - 6 มิ.ย. 2559

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารจากดอกดาวเรืองในประเทศไทย
แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2556
หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. พัชนี เจริญยิ่ง
หน่วยงานต้นสังกัด สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดและสารส่วนย่อยจากดอกดาวเรืองที่ปลูกในประเทศไทย ดอกดาวเรืองแห้งถูกสกัดด้วยเมทานอล และนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยวิธีแบ่งส่วนด้วยตัวทำละลายอินทรย์เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ DPPH assay ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดมีค่าเท่ากับ 122.388 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยรายงานเป็นค่า EC_{50} เท่ากับ 8.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตถูกนำมาแยกเป็นสารส่วนย่อยได้ 7 ส่วนย่อย (F_1-F_7) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี สารส่วนย่อยทั้งหมดถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH พบว่า สารส่วนย่อย F_5 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด (3.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาได้แก่ สารส่วนย่อย F_4 และสารส่วนย่อย F_6 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 5.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนั้นสารส่วนย่อย F_4 ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึกใหม่ พบว่าสารบริสุทธิ์คือ syringic acid มีค่า EC_{50}เท่ากับ 7.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) มีค่าEC_{50} เท่ากับ 8.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากการศึกษานี้กล่าวได้ว่าสารสกัดเอทิล แอซิเตตของดอกดาวเรืองมีศักยภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุด และเป็นแหล่งที่ประกอบด้วยสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ

คำสำคัญ: ดาวเรือง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Antioxidation Activity of Compounds from the Flower of *Tagetes erecta* Linn in Thailand
Researcher: Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying
Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Chemistry

ABSTRACT

The research aim was to analyze the antioxidant activity of extracts and fractions of *Tagetes erecta* Linn flowers, cultivated in Thailand. The dried flowers of *T. erecta* were extracted with methanol. The methanol extract was further partitioned with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The total phenolic content and antioxidant activity of extracts and fractions were evaluated according to Folin-Ciocalteu method and DPPH assay, respectively. The results indicated that the highest amount of total phenolic content was found in the ethyl acetate extract at concentration of 122.388 mg GAE/g dried weight, among all other extracts and the 50% DPPH radical effective concentration with an EC_{50} value of 8.1 µg/mL. The ethyl acetate extract was isolated by chromatographic techniques to obtain seven fractions (F_1-F_7). All subfractions obtained were submitted to a DPPH assay. The results found that the subfraction F_5 exhibited the highest antioxidation activity (3.0 µg/ml) followed by subfraction F_6 and subfraction F_4 which EC_{50} values were 5.4 µg/mL and 5.8 µg/mL, respectively. The chemical constituents of subfraction F_4 were also investigated. The major compound was isolated by chromatographic techniques and recrystallization. Its structure was identified as syringic acid which EC_{50} value was 7.6 µg/mL. The value is comparable with that of standard BHT (EC_{50} 8.3 µg/mL). This study revealed that the ethyl acetate extract of flower of *T. erecta* has strong antioxidant potential and is a valuable source of natural antioxidants.

Keywords: *Tagetes erecta* Linn Total phenolic content Antioxidation Extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย คุณรัฐตะวัน พูลรมย์ ที่ตั้งใจและอดทนต่อการทำงานนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ดอกดาวเรืองสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ สาขาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้คำแนะนำในวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

พัชนี เจริญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	3
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 สารสำคัญในพืชสมุนไพร	5
2.2 การเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย	11
2.3 สารต้านออกซิเดชัน	13
2.4 การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Scavenging Activity on DPPH radical)	18
2.5 ดาวเรือง	19
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง	25
3.2 สารเคมีและสภาวะที่ใช้ในการทดลอง	25
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	25
3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	26
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกดาวเรือง	26
3.6 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี	27
3.7 การเตรียมคอลัมน์และการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี	28
3.8 การแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโทกราฟี	28
3.9 การหาส่วนประกอบทางเคมีของดอกดาวเรือง	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	31
4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง	31
4.2 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง	31
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบดอกดาวเรืองด้วยวิธี DPPH	32
4.4 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต	34
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7 ด้วยวิธี DPPH	34
4.6 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5	35
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี DPPH	36
4.8 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของดอกดาวเรืองด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometer	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	41
5.1 สรุปผลการวิจัย	41
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	44
บรรณานุกรม	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 น้ำหนักสารสกัดและผลได้ร้อยละ	31
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง	32
4.3 ค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง	33
4.4 การแยกสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต	34
4.5 ค่า EC_{50} ของสารส่วนย่อย F_1-F_7	35
4.6 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันดอกดาวเรือง	38
4.7 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเฮกเซน	39
4.8 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน	39
4.9 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบบิวทานอล	40

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว	12
2.2	โครงสร้างของ DPPH ก่อนและหลังเกิดปฏิกิริยากับ Antioxidant (AH)	19
2.3	ดอกดาวเรือง	19
2.4	*C. arvensis* L. (GWM) และ *C. officinalis* L. (CM)	22
3.1	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี Solvent Partitioning Extraction	31
4.1	สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง	33
4.2	สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7	35
4.3	โครงสร้างของ syringic acid	36
4.4	สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการค้นพบสารต่างๆ หลายชนิดจากสารสกัดจากพืชสมุนไพร ซึ่งสารสกัดเหล่านั้นมีประโยชน์มากและมีการใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในและต่างประเทศ เพื่อการควบคุมคุณภาพให้ทัดเทียมยาจากสมุนไพรของต่างประเทศและยาแผนปัจจุบัน การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งของการควบคุมคุณภาพ โดยสารสำคัญที่แยกออกมาได้สามารถใช้เป็นสารมาตรฐาน จากความก้าวหน้าของเทคนิคการแยกสาร จึงได้มีผู้ทำการทดลองนำสารสกัดจากธรรมชาติต่างๆมาสกัด เพื่อหาประโยชน์จากสารธรรมชาติ ทำให้ผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นยาเวชสำอาง เครื่องสำอาง หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อาทิเช่น ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidation) ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสาเหตุให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นที่เชื่อกันว่าอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง เนื้องอก การเกิดริ้วรอยก่อนวัย เป็นต้น ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ในการช่วยต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระที่รู้จักกันดีเช่น วิตามินซี วิตามินอี เบตาแคโรทีน แคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น นอกจากการใช้สารสำคัญจากพืชสมุนไพรเป็นสารต้านออกซิเดชันแล้วยังมีสารบางกลุ่มใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเวลาเดียวกัน ตัวอย่างของพืชสมุนไพรที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และในขณะเดียวกันสามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ เช่น ขมิ้นชัน บัวบก มังคุด ไพร เป็นต้น ซึ่งนับได้ว่าเป็นการดีถ้านักวิจัยสามารถแยกสารสำคัญในกลุ่มนี้ออกมาได้

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและกลุ่มสารต้านออกซิเดชันของดาวเรือง *(Tagetes erecta* Linn.) โดยเน้นศึกษาเฉพาะส่วนดอก ดาวเรืองอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีชื่อสามัญคือ African marigold เป็นต้นไม้พื้นบ้านซึ่งคนไทยคุ้นเคยกันดีโดยเฉพาะส่วนดอก จากความสวยและโดดเด่นของดอกดาวเรืองคนไทยจึงนิยมนำมาใช้ร้อยเป็นมาลัยถวายพระ หรือนิยมนำมาปลูกประดับสถานที่ ประโยชน์และสรรพคุณทางยาของดาวเรืองได้แก่ ใบ ใช้เป็นยาเย็น ทาแผลเน่าเปื่อย ฝีต่างชนิดต่างๆ น้ำคั้นจากใบใช้หยอด แก้เจ็บหู ดอก แก้ริดสีดวงทวาร เป็นยาฟอกเลือด ขับลม ละลายเสมหะ ไอหลอดลมอักเสบ ปรุงกับตับไก่ใช้เป็นยาบำรุงสายตา ดอกแห้งบดเป็นผงผสมกับอาหารไก่ ช่วยให้ไข่แดงสีเข้มขึ้น จากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของดอกดาวเรือง พบว่าดอกดาวเรืองชนิด Maxican Marigold เป็นแหล่งสะสมของสารต้านออกซิเดชันพวกลูทีนตามธรรมชาติ[1] และจากงานวิจัยเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกดาวเรืองมีปริมาณของสารฟีนอลลิกในระดับที่สูงและเมื่อนำมาทดสอบกับ DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) ให้ค่า EC_{50} ใกล้เคียงกับ BHT (2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol)[2] สำหรับงานวิจัยในด้านการหาสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากดอกดาวเรืองยังไม่มีพบรายงานการวิจัย จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษากลุ่มสารต้านออกซิเดชันและแยกสารกลุ่มนี้ออกมาในรูปสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลใหม่ในการนำสารธรรมชาติในการต้านออกซิเดชันและสามารถนำไปพัฒนาให้ใช้ได้จริงตามที่ตั้งสมมุติฐานไว้ต่อไปในอนาคตโดยเฉพาะการนำไปพัฒนาในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาศักยภาพการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกดาวเรือง
2. เพื่อแยกสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกดาวเรือง
3. เพื่อวิเคราะห์ชนิดและโครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการต้านออกซิเดชัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. การสกัดแยกสารจากดอกดาวเรืองที่มีศักยภาพในการต้านออกซิเดชัน ใช้วิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์
2. สกัดและแยกสารธรรมชาติที่มีศักยภาพในการต้านออกซิเดชัน
3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบส่วนย่อย และสารธรรมชาติในรูปของสารบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ
4. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในแต่ละการทดสอบโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมสารสกัดหยาบด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent Partition Extraction) พืชที่ใช้ในการทดลองคือส่วนของดอกดาวเรือง ที่มีระยะเวลาการปลูก 45 วัน จากแปลงเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยคัดเลือกดอกที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคและแมลงรบกวน และเป็นดอกที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ทำความสะอาดดอกพืชตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งลมให้แห้งในที่ร่ม และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า และนำมาสกัดด้วยวิธีการหมักด้วยเมทานอล กรองสารละลาย และระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาบเมทานอล จากนั้นนำสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 2.1 สารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 1 ถูกส่งไปทดสอบทางเภสัชวินิจฉัย ณ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกนำมาหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ตามวิธีของ Javanmardi[3] และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay (Scavenging activity of free radical)

การทดลองที่ 2.2 การแยกสารส่วนย่อยและการทดสอบฤทธิ์ของสารส่วนย่อย

นำสารสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.1 มาทำการทดสอบเพื่อหาตัวทำละลาย ที่เหมาะสมในการแยกสารโดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมจึงทำการแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากนั้นนำสารส่วนย่อยที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 2.3 การแยกสารบริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์

นำสารส่วนย่อยที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจากการทดลองที่ 2.2 มาดำเนินการแยกสารบริสุทธิ์โดยละเอียดอีกครั้งหนึ่งด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

ขั้นตอนที่ 3 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติและโครงสร้างสารออกฤทธิ์

หลังจากทำการแยกสารและตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์แล้วนั้น สารดังกล่าวจะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี รวมทั้งโครงสร้างของสารโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปีได้แก่ FT-IR FT-NMR spectroscopy และ Mass spectrometry

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

การหาสารออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเพื่อยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระก็เป็นสิ่งที่กำลังได้รับความนิยมโดยเฉพาะการนำสารที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ ซึ่งในปัจจุบันนี้วงการแพทย์และความงาม ได้ให้ความสำคัญกับสารในกลุ่มนี้มาก เนื่องจากความเชื่อที่ว่าการเกิดอนุมูลอิสระนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องข้องในการเกิดโรคต่างๆ มากมายหลายชนิดเช่น โรคมะเร็ง เนื้องอก ตลอดจนการเกิดริ้วรอยก่อนวัย และช่วยลดความเครียดได้ ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยมากมายที่ให้ความสนใจในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่างๆของพืชสมุนไพร เช่น เมล็ดที่มีน้ำมัน ใบ เปลือก และราก เช่นเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศ [4]โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive Oxygen Species) หรือจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยตรง สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรนั้นมักพบว่าเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เช่น Gallic acids, Caffeic acid และ Tannin เป็นต้น หรือในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น Quercetin และ Rutin เป็นต้น นอกจากการพบกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรแล้วนั้นยังสามารถพบสารในกลุ่มนี้ในอาหารและเครื่องดื่มเช่น catechins ที่พบมากในชาเขียว[5] สารสกัดส่วนใบ ผล ดอก และเปลือกต้นของสะเดาพบว่าให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี[6] หรือสารในกลุ่มฟีนอลิก ที่ได้จากดอกของต้น *Garcinia dulcis*[7]

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

ดาวเรือง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
Tagetes erecta Linn.	antioxidation

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสกัดแยกสารธรรมชาติทีมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง
2. ทราบถึงสารธรรมชาติเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ออกฤทธิ์ได้
3. ได้นักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีความรู้ความสามารถ
4. ได้ข้อมูลทางวิชาการที่สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารและการประชุมวิชาการต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ได้ข้อมูลเบื้องต้นถึงคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันเพื่อการนำไปพัฒนาในอุสาหกรรมเช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง หรืออาหารเสริม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product) หมายถึง สารเคมีซึ่งเป็นสารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิต ทั้งพืชและสัตว์ รวมทั้งสมุนไพร สารเคมีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค สีผสมอาหาร สีย้อมผ้า น้ำมันหอมระเหย และอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน วิตามิน เป็นต้น ตลอดจนผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพและเครื่องสำอาง[8] โดยมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นอย่างมาก ทำให้นักเคมีหรือนักวิทยาศาสตร์สาขาอื่นๆ สนใจที่จะศึกษาหาแนวทางในการสกัดสารต่างๆ จากธรรมชาติโดยเฉพาะสมุนไพร เพื่อค้นหาผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลทางชีวภาพ (Biologically active substances) ที่สามารถนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ โดยนักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product chemist) พยายามสกัดและแยกสารอินทรีย์ต่างๆ ออกมาโดยใช้เทคนิคทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) โดยร่วมมือกับนักวิทยาศาสตร์สาขาเภสัชวิทยา จุลชีววิทยา เป็นต้น ที่อาจนำไปสู่การค้นพบตัวยาชนิดใหม่ ดังที่ปรากฏในประเทศอุตสาหกรรมที่มีการผลิตยาสังเคราะห์หลายชนิด โดยเลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดจากพืชหรือดัดแปลงลักษณะโครงสร้างเพื่อให้ได้ยาชนิดต่างๆ มากมาย

โดยปัจจุบันพบว่าสาเหตุของปัญหาที่เลวร้ายภายในร่างกายมนุษย์ อันได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหัวใจ ความแก่ ความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ล้วนมีสาเหตุมาจากการที่อนุมูลอิสระ (Free radical) ที่เกิดขึ้นในร่างกายเข้าไปทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ เป็นต้น ทำให้ร่างกายเกิดความผิดปรกติและนำมาซึ่งโรคที่สำคัญต่างๆ โดยอนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกาย รวมทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสียและไอเม่าจากเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ และยาฆ่าแมลง เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกทำลายหรือลดความรุนแรงได้ด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) โดยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ดังนั้นการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจอย่างมาก โดยสามารถนำไปในการใช้ป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคและปัญหาต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น

2.1 สารสำคัญในพืชสมุนไพร[9]

สารเคมีในพืชสมุนไพร จำแนกได้เป็น 2 จำพวกคือ

1. สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) เป็นสารที่พบในพืชชั้นสูงทั่วๆไปพบได้ในพืชเกือบทุกชนิดเป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) โดยพืชดูดน้ำ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานจากแสงแดดเพื่อสร้างสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ด้วยเหตุนี้พืชเกือบทุกชนิดจึงประกอบด้วยแป้งและน้ำตาล สารเหล่านี้มนุษย์ได้นำมาใช้เป็นอาหาร นอกจากนี้สารปฐมภูมิยังรวมถึงสารจำพวกไขมัน โปรตีน เม็ดสี (pigment) และเกลืออนินทรีย์ (Inorganic salt) ชนิดต่างๆ อีกด้วย

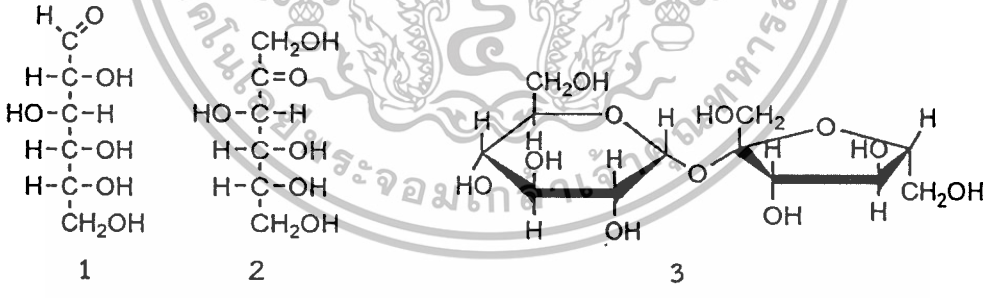
2. สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เป็นสารประกอบที่มีลักษณะค่อนข้างพิเศษต่างกันในพืชแต่ละชนิด คาดว่าสารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ในพืช ซึ่งกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารเคมีแต่ละชนิดจะมีกระบวนการที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสังเคราะห์ต่างกันนอกจากนี้ในแต่ละกระบวนการก็จะใช้เอนไซม์ (enzyme) ที่เฉพาะเจาะจงแตกต่างกันอีกด้วยโดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆในพืช ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ แอลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ น้ำมันหอมระเหย สารในกลุ่มนี้ส่วนมากจะมีสรรพคุณทางยาหรือเป็นสารพิษ สารเคมีในพืชสมุนไพรมีมากมายหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่าสารสำคัญ (active constituents) สามารถนำมาใช้เป็นยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่มดังนี้

1. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน (carbon) ไฮโดรเจน (hydrogen) และออกซิเจน (oxygen) โดยไฮโดรเจนและออกซิเจนมักพบในสัดส่วน 2:1 เป็นกลุ่มสารที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ คาร์โบไฮเดรตในพืชสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสงและเก็บสะสมไว้ ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตที่นำมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม เช่น

- แป้ง ใช้เป็นสารช่วยเพิ่มปริมาณ (diluent) และสารช่วยการแตกตัวยาเม็ด (disintegrating agent)
- น้ำผึ้ง ประกอบด้วยกลูโคส (glucose) 1 และฟรุตโทส (fructose) 2 เป็นส่วนใหญ่ ใช้เป็นส่วนประกอบในยาแก้ไอ ใช้เตรียมน้ำเชื่อมและมีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อนๆ
- วุ้น (agar) เป็นสารจำพวกคอลลอยด์ (colloid) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง ประกอบด้วยอะกาโรส (agarose) ซึ่งเป็นส่วนทำให้วุ้นแข็งตัว และอะกาโรเพกทิน (agaropectin) ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวกับความหนืดของวุ้น ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (stabilizing agent) สารช่วยในการเตรียมอิมัลชัน (emulsifying agent) และใช้เป็นยาระบาย
- น้ำตาลทราย (sucrose) 3 พบมากในบีทรูทและอ้อย ฯลฯ ใช้เป็นสารแต่งรสหวาน (sweetening agent) และใช้เตรียมน้ำเชื่อม



1 2 3

2. ไขมัน (Lipids) เป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว (long chain fatty acid) จับกับแอลกอฮอล์ นำมาเป็นอาหารหรือใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม เช่น

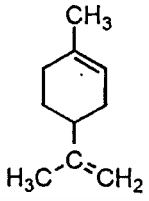
- น้ำมันถั่วเหลืองหรือน้ำมันข้าวโพด ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับยาฉีด ใช้เตรียมอิมัลชัน (emulsion) และใช้เป็นอาหาร
- น้ำมันมะกอก ใช้เป็นสารหล่อลื่น (emollient) และใช้เป็นยาระบาย เป็นต้น

3. น้ำมันหอมระเหย (volatile oils หรือ essential oils หรือ ethereal oils) พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิธรรมดา ไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งไว้นานๆ อาจถูกออกซิไดส์ (oxidised) ทำให้สีเข้มขึ้น จึงต้อง

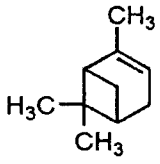
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีซึ่งซับซ้อน อาจจำแนกน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบได้หลายกลุ่มดังนี้

3.1 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก (hydrocarbon volatile oils) เช่น limonene 4 ในน้ำมันกระวาน (cardamom oil), pinene 5 ในน้ำมันสน (turpentine oil) และในน้ำมันไพล เป็นต้น

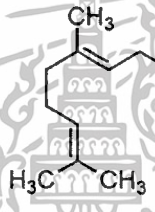


4

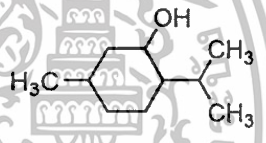


5

3.2 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก (alcohol volatile oils) เช่น geraniol 6 ในน้ำมันดอกกุหลาบ (rose oil) และ menthol 7 ในน้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil) เป็นต้น

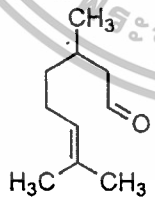


6

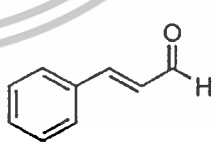


7

3.3 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก (aldehyde volatile oils) เช่น citronellal 8 ในน้ำมันตะไคร้หอม (citronella oil) และ cinnamaldehyde 9 ในน้ำมันอบเชย (cinnamon oil) เป็นต้น



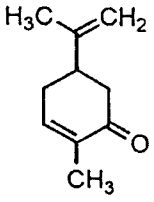
8



9

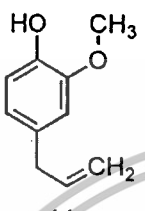
3.4 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกคีโทนเป็นองค์ประกอบหลัก (ketone volatile oils) เช่น carvone 10 ในน้ำมันเทียนตากบ (caraway oil) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

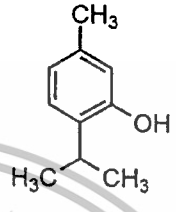


10

3.5 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก (phenol volatile oils) เช่น eugenol 11 ในน้ำมันกานพลู (clove oil) และ thymol 12 ในไทม์ออยด์ (thyme oil) เป็นต้น

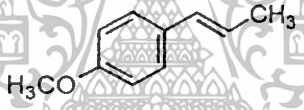


11



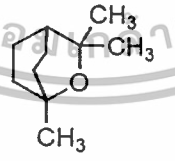
12

3.6 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลิกอีเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (phenolic ether volatile oils) เช่น anethole 13 ในน้ำมันจันทน์แปดกลีบหรือน้ำมันโป๊ยกั๊ก (anise oil) และในน้ำมันเทียนข้าวเปลือก (fennel oil) เป็นต้น



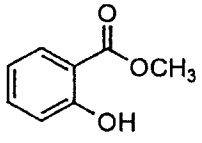
13

3.7 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก (oxide volatile oils) เช่น eucalyptol 14 ในน้ำมันยูคาลิปตัส (eucalyptus oil) และในน้ำมันเสม็ดขาว (cajuput oil) เป็นต้น



14

3.8 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (ester volatile oils) เช่น methyl salicylate 15 ในน้ำมันระกำ (wintergreen oil) เป็นต้น



15

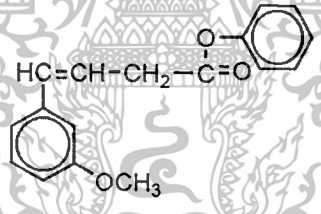
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยและนำมารักษาโรค เช่น น้ำมันกานพลูจากดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum L.*) ในวงศ์เมอร์ทาซีอี (Myrtaceae) ใช้บรรเทาอาการปวดฟัน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ หรือน้ำมันจากเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) ในวงศ์ซิงจิเบอราซีอี (Zingiberaceae) มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ฟกช้ำ แก้เคล็ดขัดยอก เป็นต้น

4. เรซินและบาลซัม (resins and balsams) สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเรซินและสารประกอบที่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ เช่น โอเลโอเรซิน (oleoresins) โอเลโอกัมเรซิน (oleo-gum-resins) และบาลซัม (balsums) เป็นต้น

เรซิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสารเคมีหลายชนิดรวมกัน ได้แก่ กรดเรซิน (resin acids), เรซินแอลกอฮอล์ (resin alcohols), เรซีน (resene) และเอสเทอร์ (ester) จัดเป็นสารประกอบที่มีรูปทรงอสัณฐานเป็นก้อนแข็ง เมื่อทำให้ร้อนจะเหนียวหนืดและค่อยๆ หลอมละลาย เรซินที่นำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม ได้แก่ ชันสน (rosin หรือ colophony) เป็นเรซินแข็งที่ได้จากสน (*Pinus* spp.) หลายชนิดในวงศ์ไพนาซีอี (Pinaceae) ใช้ทำยามีสีชาอ่อน ใช้เป็นสารช่วยให้ผลิตภัณฑ์แข็งตัว (stiffening agent) ในยาเตรียมขี้ผึ้ง และยังใช้เป็นยาขับปัสสาวะสำหรับสัตว์อีกด้วย

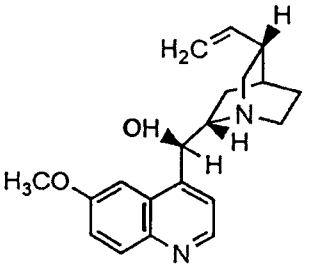
บาลซัม เป็นสารผสมเรซิน (resinous mixture) ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก (benzoic acid) หรือกรดซินนามิก (cinnamic acid) หรือกรดทั้งสองชนิดนี้ บาลซัมที่นำมาใช้ในทางเภสัชกรรม ได้แก่ กำยาน (benzoin) ได้จากเปลือกต้นของพืชตระกูลสไทแรคส์ (*Styrax benzoin*) ในวงศ์สไทราซีอี (Styraceae) ในทางการค้ารู้จักกันดีในชื่อของกำยานไทยและกำยานสุมาตรา โดยกำยานไทยประกอบด้วยผลึก coniferyl benzoate 16 ใช้แต่งกลิ่นเครื่องสำอาง ส่วนกำยานสุมาตราใช้ทางยาเป็นองค์ประกอบในดอมพาวด์เบนซอยด์ทิงเจอร์และใช้มากในอุตสาหกรรมแลกเกอร์



16

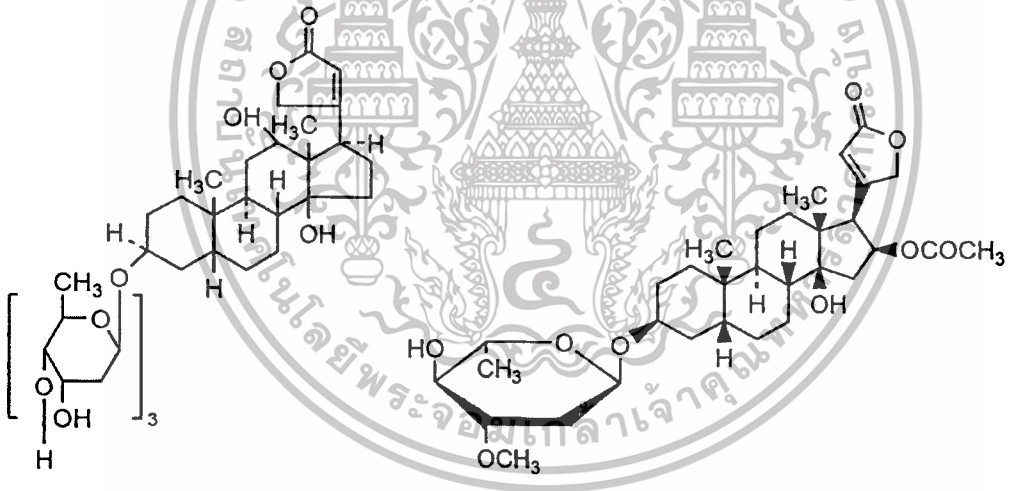
5. แอลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่มากที่สุดกลุ่มหนึ่งที่ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง พบมากในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ คุณสมบัติทั่วไปของแอลคาลอยด์ คือ มักมีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ มีคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมาก เช่น quinine 17 จากเปลือกต้นชิงโคนา (*Cinchona succirubra* Pav.) ในวงศ์รูเบียซีอี (Rubiaceae) ใช้รักษาไข้มาลาเรียจากเชื้อ พลาสโมเดียมฟาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งดื้อต่อยาสังเคราะห์คลอโรควิน (chloroquine)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



17

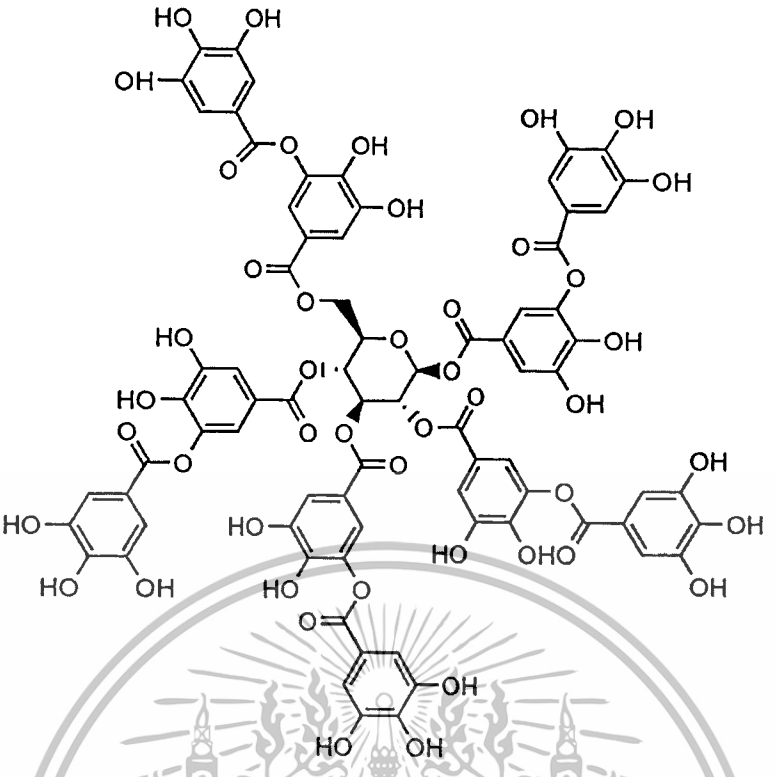
6. ไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนอะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลหรือเรียกส่วนไกลโคน (glycone) จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวาง และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ โดยทั่วๆ ไปไกลโคไซด์จะละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้วขึ้นกับจำนวนและชนิดน้ำตาลของโครงสร้างไกลโคนของไกลโคไซด์ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเกิดการสลายพันธะที่เชื่อมต่อระหว่างอะไกลโคนและไกลโคน ตัวอย่างไกลโคไซด์เช่น digoxin 18 จากใบของพืชสกุลดิจิทาลิส (*Digitalis lanata* Ehrh.) มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด ใช้รักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติของหัวใจหรือ oleandrin 19 จากใบยี่โถ (*Nerium incidum* Mill) มีฤทธิ์เช่นเดียวกับดิจอกซินเป็นต้น



18 19

7. แทนนิน (tannins) เป็นสารพวกพอลิฟีนอล (polyphenol) มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อนเช่น tannic acid 20 พบได้ในพืชหลายชนิด มีรสฝาด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



20

2.2 การเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย[10]

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกร่างกายดังนี้

1. ปัจจัยภายในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่า กระบวนการเมทาบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (auto-oxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1) ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$RH + \text{initiator} \xrightarrow{\text{Light, T}} R\bullet + H\bullet \qquad (1)$$

2) ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) (2.1) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydro peroxide) และอนุมูลอิสระ (2.2) ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ดังสมการ

$$R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet \qquad (2.1)$$

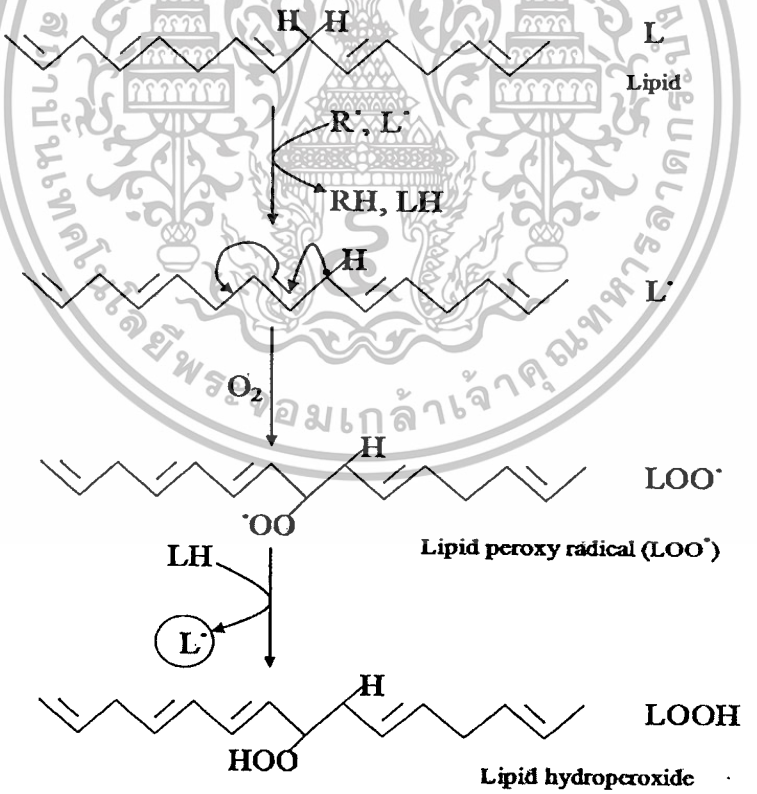
$$ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet \qquad (2.2)$$

3) ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ

$$R\bullet + R\bullet \longrightarrow RR \qquad (3.1)$$

$$ROO\bullet + ROO\bullet \longrightarrow ROOR + O_2 \qquad (3.2)$$

ตัวอย่างเช่น กลไกการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน เริ่มต้นเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว (LH) ถูกอนุมูลอิสระ (R•) ดึงไฮโดรเจนออก ทำให้เกิดอนุมูลอิสระบนอะตอมคาร์บอนของลิปิด และเกิดอนุมูลลิปิด (L•) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้อย่างรวดเร็วเกิดเป็นอนุมูลลิปิดเปอร์ออกซี (LOO•) และทำปฏิกิริยาต่อไปกับลิปิดโมเลกุลอื่นๆ เกิดลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (LOOH) กับอนุมูลลิปิด (L•) ใหม่ๆ เพิ่มเข้าสู่วงจร และอนุมูลลิปิดที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่กับลิปิดโมเลกุลอื่นๆ ต่อไปเรื่อยๆ (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ในที่สุด[11]



ภาพที่ 2.1 กระบวนการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง **ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็งเช่น** bleomycin, antracyclines **และ** methotrexate **เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน** (prooxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X-ray), **รังสีแกมมา** (γ-ray) **อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป** (secondary reaction) **กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น**

ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO), **ไนโตรเจนออกไซด์** (NO_2) **และเพอรอกซีไนไตรท์** ($ONOO^-$) **รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์** (SO_2) **และคาร์บอนเตรตตะคลอไรด์** (CCl_4) **ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอ็นไซม์ ไซโตโครม** P-450 **ไฮดรอกซีเจส** (cytochrome P-450 hydroxylase) **ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว**

โอโซน ไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นร่างกายจำเป็นต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น โดยสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือระบบแอนตี้ออกซิแดนท์ (antioxidants) **ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร** (substrate) **ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยสาร** (substrate) **เหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบแอนตี้ออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า** oxidative stress **ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ** S-H **และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่** (aging) **และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน** (autoimmune disease) **โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไปเลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้นๆ มาก่อน** (reoxygenation injury, reperfusion injury) **รวมไปถึงโรคมะเร็ง เป็นต้น**

2.3 สารต้านออกซิเดชัน[12]

สารต้านออกซิเดชัน คือ สารที่มีสมบัติป้องกันหรือช่วยทำให้ไขมันหรือน้ำมันเกิดการหืนได้ช้าลง จึงเป็นสารที่มักนำมาเติมลงในไขมัน น้ำมัน ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันและเครื่องสำอางพวกครีม เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ไขมัน น้ำมัน และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันมีความคงตัว รักษาคุณลักษณะ กลิ่นและรสชาติไว้ได้นานขึ้น

สมบัติของสารต้านออกซิเดชันที่ดี ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

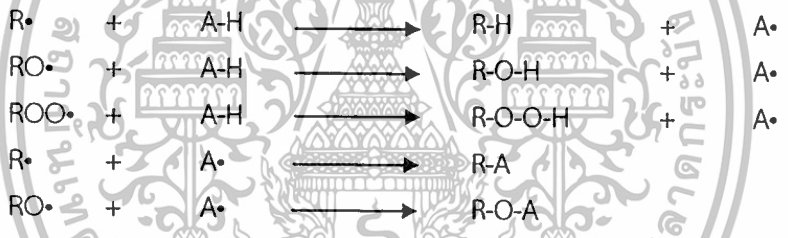
1. ต้องไม่มีโทษต่อร่างกาย
2. ไม่ทำให้ไขมัน น้ำมันหรืออาหารที่เติมสารต้านออกซิเดชันมีสี กลิ่นและรสชาติเปลี่ยนไป
3. ให้ผลในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ความเข้มข้นต่ำ
4. ละลายได้ดีในไขมันและวิตามินซีจะละลายน้ำได้ดี
5. หาซื้อได้ทั่วไปและมีราคาถูก

เครื่องเทศหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ เช่น ขิง (Ginger) พริกไทยดำ (Pepper) โรสแมรี่ (Rosemary) เสจ (Sage) ลูกจันทน์ (Nutmeg) อบเชย (Cinnamon) ต้นไทม (Thyme) ขมิ้น (Turmaric) เป็นต้น

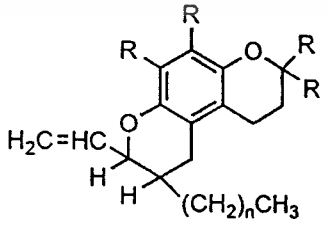
กลไกการทำงานของสารต้านออกซิเดชัน

หน้าที่สำคัญที่สุดของสารต้านออกซิเดชันในอาหาร คือ ยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง ในกรณีที่ไม่ใช่อาหาร เช่น ในน้ำมันรถยนต์ (Gasoline) น้ำมันหล่อลื่น (Lubrications) ยาง (Rubber) และสารอื่นๆ สารต้านออกซิเดชันจะทำหน้าที่เป็น Peroxide decomposers

สารต้านออกซิเดชันบางชนิด เช่น วิตามินซีจะทำหน้าที่ต้านออกซิเดชัน โดยวิตามินซีจะถูกออกซิไดส์ก่อนสารอื่น ตัวอย่างการทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน (autoxidation) ของสารต้านออกซิเดชันมีดังสมการ โดยกำหนดให้สารต้านออกซิเดชันมีสูตรเป็น AH จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระต่างๆ เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่องได้ดังนี้



จากสมการของปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าสารต้านออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน ทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระลดน้อยลง และมีสารประกอบที่เกิดขึ้นใหม่ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันกับออกซิไดส์ลิพิด ตัวอย่างเช่น การใช้วิตามินอีหรือโทโคฟีรอลเป็นสารต้านออกซิเดชันให้แก่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในน้ำมัน จะพบว่ามีสารประกอบของ Tocopherol-linoleic acid 21 เกิดขึ้น ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



21

ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่ใช้เติมลงในอาหารมีความสำคัญมาก เนื่องจากต้องคำนึงถึงราคา ความปลอดภัย กลิ่น รสชาติ และความสามารถในการทำหน้าที่ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ต้องนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวข้องด้วย ความสามารถในการทำหน้าที่ของสารต้านออกซิเดชันมีความแปรผกผันมาก สารต้านออกซิเดชันบางชนิดจะทำหน้าที่ต้านออกซิเดชันได้ดีขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น บางชนิดให้ผลดีที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ เท่านั้น การใช้ปริมาณที่มากเกินไปหรือมีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจกลายเป็นโปรออกซิแดนซ์ (Pro-oxidant) ได้

สารต้านออกซิเดชันที่ใช้ในอาหาร

สารต้านออกซิเดชันที่ใช้เติมลงในอาหารส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ ได้แก่

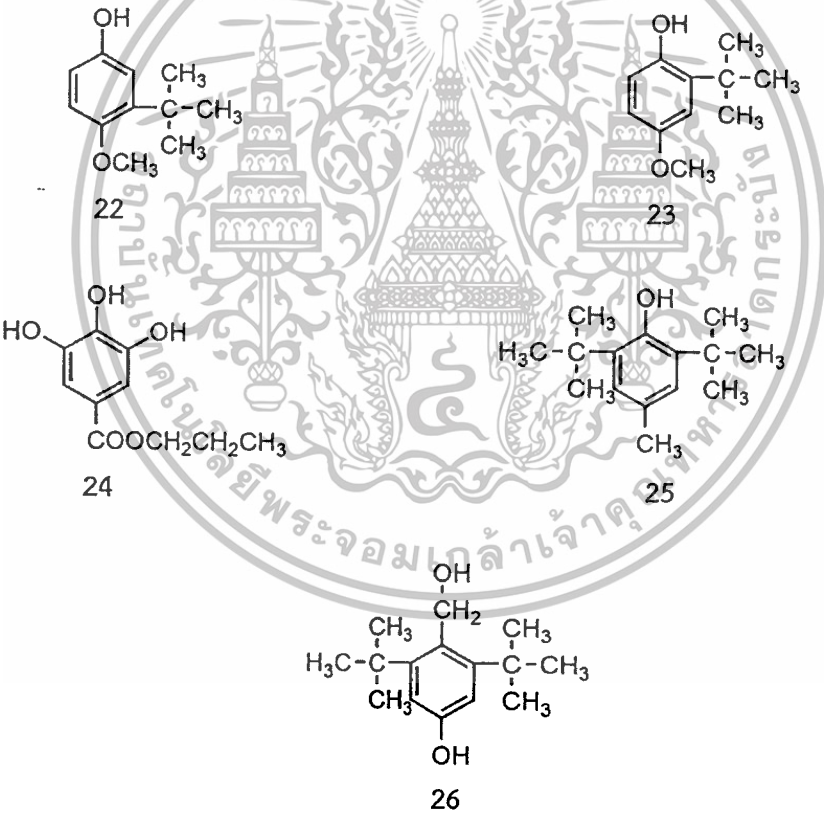
1. Butylated hydroxyanisole (BHA) เป็นส่วนผสมของ 2-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole **22** และไอโซเมอร์ของมัน คือ 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole **23**

2. เอสเทอร์ของ Gallic acid คือ Propyl gallate (PG) **24**

3. Butylated hydroxytoluene (BHT) หรือ 2, 6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol **25**

4. Di-*tert*-butyl hydroxyquinone (TBHQ) **26**

สารต้านออกซิเดชันดังกล่าวนิยมใช้มากในอาหาร และได้รับการรับรองจาก US-FDA ว่าปลอดภัย สูตรโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน มีดังนี้

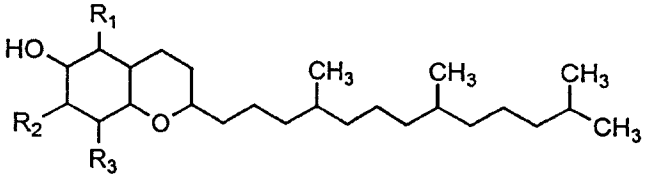


สำหรับสารต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริก กรดตาร์ตาริก เลซิทิน วิตามินอี (โทโคฟีรอล) ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ โทโคฟีรอล ชนิดแอลฟา-บีตา-แกมมา-และเดลตา-โทโคฟีรอล

Tocopherols **27** ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติ ให้กับสิ่งมีชีวิตในเซลล์และเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ ปริมาณโทโคฟีรอลที่เหลืออยู่ในน้ำมันพืชภาพหลังที่ผ่านกระบวนการทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริสุทธิ์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันให้แก่น้ำมัน นอกจากนั้นสารพวกเลซิทินและฟอสฟาไตด์ก็มี antioxidant activity ด้วย รวมทั้งสารพวกฟลาโวน (flavones) สเตอรอล และ sulfhydryl compounds[13]



27

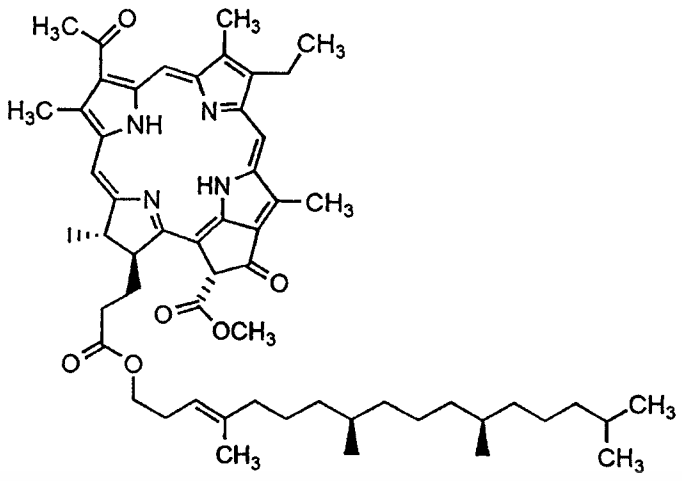
1. แคโรทินอยด์ เป็นสารที่ให้สีส้มและสีเหลืองที่พบในพืช ในพืชผักใบสีเขียวเข้มหลายชนิดมีแคโรทินอยด์สูง เพียงแต่มองไม่เห็นสีส้มสีส้มเนื่องจากถูกสีเขียวของสารคลอโรฟิลล์บดบังไว้จนหมด สารกลุ่มแคโรทินอยด์มีอยู่มากถึง 600 ชนิด สารกลุ่มนี้หลายชนิดทำงานในลักษณะของสารต้านออกซิเดชัน มีคุณสมบัติป้องกันมะเร็งที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระได้ สารกลุ่มนี้หลายชนิดแสดงคุณสมบัติของสารเริ่มต้นสร้างวิตามินเอ อย่างเช่น β-Carotene 28 ซึ่งเป็นสารสีส้มที่พบมากในผักผลไม้หลายชนิด

28

2. คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) 29 เป็นสารเคมีพืชหรือพฤกษเคมีสำคัญอีกตัวหนึ่ง คลอโรฟิลล์เป็นสารสีเขียวที่พบมากในพืช มีการนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมานาน สารในกลุ่มนี้มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ตัวที่สำคัญได้แก่ คลอโรฟิลล์กับคลอโรฟิลลิน มีรายงานทางการแพทย์ว่า สารทั้งสองชนิดนี้ช่วยป้องกันโรคมะเร็งบางชนิดได้ สารคลอโรฟิลลินสามารถรวมตัวกับสารก่อมะเร็งอย่างสารอัฟลาท็อกซิน B1 ให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่หมดฤทธิ์ นักวิทยาศาสตร์พบว่าในอาหารบางชนิดที่มีฤทธิ์ป้องกันมะเร็ง สารคลอโรฟิลอาจเข้าไปมีส่วนเกี่ยวข้องอยู่ด้วย อย่างเช่น สารฟีโอไฟติน (pheophytin) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารคลอโรฟิลพบในชาเขียวอาจทำร่วมกับสารพฤกษเคมีอื่นๆ ในกลุ่มฟีนอลเสริมฤทธิ์ในการป้องกันมะเร็งก็ได้

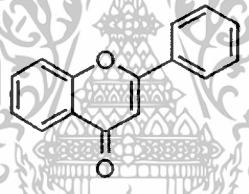
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



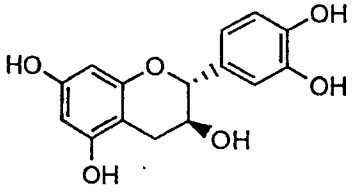
29

3. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เช่น สาร 30 เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่พบได้ในผักและผลไม้ กลุ่มนี้สำคัญมากและมีอยู่ด้วยกันหลายฟอร์ม เช่น ฟลาวานอล ฟลาวาโนน แอนโธไซยานิดินส์ ฟลาโวนส์และฟลาโวนอลส์ สารฟลาโวนอยด์ที่พบว่า ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชัน อย่างเช่น รูติน มอรินคะเตชิน เกอเซติน ฟิเซอติน และกอสสิเปติน สารพวกนี้พบในพืชหลายชนิดเช่น ชาเขียว ไวน์แดง หัวหอม และกระเทียม



30

4. สารคะเตชิน (Catechin) 31 เป็นสารประกอบทางเคมีชนิดหนึ่งของโพลีฟีนอล (Polyphenols) ที่รู้จักกันดีในนามของแทนนิน (Tannin) เป็นสารสกัดธรรมชาติจากใบชาเขียวซึ่งอ่อนโยนต่อร่างกายและธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการทำงานหลายๆ อย่างได้ ใช้เป็นยาฝาดสมานแผลชนิดหนึ่ง เช่น ผลลัพธ์ในการลดการเกิดกลิ่น ผลลัพธ์ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยารวมตัวกันกับออกซิเจน

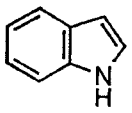


Catechin 31

5. อินโดลส์ (Indole) 32 กะหล่ำรวมถึงพืชผักกลุ่มใกล้เคียงกันที่เรียกว่า กลูซิเฟอรัส อย่างเช่น ผักคะน้า หัวปลี ซึ่งมีสารเคมีอินโดลส์อยู่ในปริมาณพอสมควรที่ทำให้ใช้ป้องกันมะเร็งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

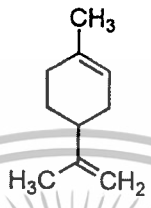
142898



Indole 32

6. กลุ่มสารต้านโปรติเอส ในถั่วเหลือง มะเขือเทศ และพืชบางชนิด ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

7. กลุ่มเทอปีน (Terpene) เช่น สาร 33 พบได้ในพืชและผลไม้หลายชนิด ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง

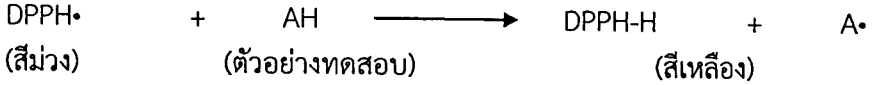


Terpene 33

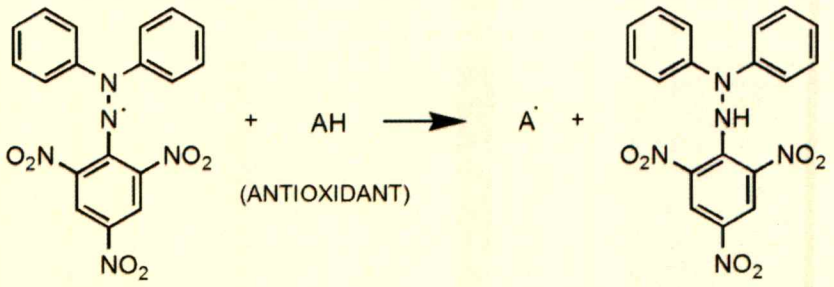
2.4 การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Scavenging activity on DPPH radical)[14]

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดการลดลงของ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความเสถียร สามารถนำไปใช้ในการวัดความสามารถของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยการจับกับอิเล็กตรอนให้แก่อนุมูลอิสระ DPPH จะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ DPPH ที่มีความคงตัว ทำให้ DPPH ซึ่งมีสีม่วงแดงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ) และทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตร มีค่าลดลง หากสารตัวอย่างใดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระหรือสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี จะทำให้สีม่วงแดงของ DPPH จางลงได้มากกว่าสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อย และมักเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyanisole (BHA) หรือ alpha-Tocopherol เป็นต้น โดยแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ DPPH โดย DPPH• จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) แสดงดังสมการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



DPPH (Violet, 517 nm) DPPH-H (Colorless)

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของ DPPH ก่อนและหลังเกิดปฏิกิริยากับ Antioxidant (AH)

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้ โครงสร้างทางเคมีของ DPPH• ที่แสดงจะเห็นว่าอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรทำให้สารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆ ที่สารต้านออกซิเดชันนั้นมีฤทธิ์ที่ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี[15]

2.5 ดาวเรือง[16]

ภาพที่ 2.3 ดอกดาวเรือง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tagetes erecta* L.
ชื่อวงศ์ : Compositae
ชื่อสามัญ : Marigold
ชื่อพื้นเมือง : ดอกคำพู่จู้ คำปูจู้หลวง ดาวเรืองใหญ่ พอทู ดาวเรืองอเมริกัน
ลักษณะทั่วไป : ดาวเรืองเป็นไม้ล้มลุกสูง 15-60 ซม. ใบประกอบแบบขนนก เรียงตรงข้ามใบย่อยรูปวงรี กว้าง 0.5-1.5 ซม. ยาว 1.5-5 ซม. ขอบใบหยักฟันเลื่อย ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง ดอกย่อยมี 2 ลักษณะคือ ดอกไม่สมบูรณ์เพศ คือ อยู่บริเวณรอบนอก จำนวนมากสีเหลืองหรือเหลืองส้ม ลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คล้ายลิ้น บานแผ่ออก ซ้อนกันหลายชั้นปลายม้วนลง ดอกสมบูรณ์เพศมีลักษณะเป็นหลอดเล็กๆจำนวนมาก รวมกลุ่มอยู่บริเวณกลางช่อดอก ผลเป็นผลแห้งไม่แตกมีสีดำ

การใช้ประโยชน์ :

- ไม้ประดับ
- สมุนไพร
- สีของดอกใช้เป็นสีย้อมผ้า
- เพื่อจำหน่าย ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ใช้ทำพวงมาลัย ใช้ปักแจกัน
- ป้องกันแมลง เนื่องจากดาวเรืองเป็นสารที่มีกลิ่นเหม็นแมลงไม่ชอบ จึงสามารถใช้เป็นเกราะป้องกันแมลงให้แก่พืชอื่นๆ ในรากของดาวเรืองมีสารชนิดหนึ่งคือ แอลฟาเทอร์เธียนิล(α - terthienyl) ซึ่งเป็นสารที่สามารถควบคุมปริมาณไส้เดือนฝอยในดินได้เป็นอย่างดี
- ดอกดาวเรืองผสมในอาหารสัตว์เป็นอาหารเสริม เนื่องจากดาวเรืองเป็นพืชที่สารแซนโทฟิลส์ (Xanthophylls) สูง จึงสามารถนำไปเป็นส่วนผสมอาหารสัตว์ได้ดี โดยเฉพาะอาหารของของไก่ไข่จะทำให้ไข่แดงมีสีแดงสดใสน่ากินยิ่งขึ้น
- สารสกัดจากดอกดาวเรืองจะให้สารสำคัญคือ Lutein 34 ซึ่งเป็นสารอาหารในกลุ่มที่เรียกว่าแซนโทฟิลส์ (xanthophylls) มีลักษณะเป็นสารสีเหลือง อยู่ในจำพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีประโยชน์ต่อดวงตาเพราะเป็นสารสำคัญที่อยู่ในจุดรับภาพของดวงตาที่เรียกว่า "มาคูลา (Macula)" สารอาหารลูทีนจะช่วยกรองแสงหรือป้องกันรังสีที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อดวงตา นอกจากนี้ลูทีนยังช่วยปกป้องไม่ให้เซลล์ของจอประสาทตาถูกทำลาย และยังช่วยลดความเสี่ยงในการเป็นโรคต้อกระจก (Cataracts) โรคกระจกตาเสื่อม (AMD) ซึ่งชาวต่างประเทศรู้จักสารอาหารลูทีนกันอย่างกว้างขวางว่าเป็นสารอาหารที่ช่วยชะลออาการจอประสาทตาเสื่อมของผู้ใหญ่ จึงมีการศึกษาประโยชน์ของลูทีนที่มีต่อการปกป้องจอประสาทตาเพิ่มมากขึ้น บทบาทของลูทีนที่มีต่อดวงตานั้น พบว่าภายในจอประสาทตาของคนเรามีร่องเล็กๆ อยู่จุดหนึ่งที่มีเซลล์รับภาพจอประสาทตาซึ่งเป็นจุดที่แสงตกกระทบและทำให้คนเราสามารถมองเห็นภาพที่ชัดเจนในแต่ละวัน ซึ่งบริเวณเซลล์รับภาพนี้มีสารสีเหลืองหรือลูทีนอยู่หนาแน่นมากที่สุด โดยจะพบได้ตรงชั้นเนื้อเยื่อที่หล่อเลี้ยงเส้นประสาท ซึ่งจุดดังกล่าวเป็นจุดที่สำคัญมากต่อการมองเห็น หากบริเวณดังกล่าวเสื่อมหรือเสียไป อาจทำให้สูญเสียการมองเห็นหรือตาบอดได้ โดยสารลูทีนในเซลล์รับภาพของจอประสาทตานี้ จะทำหน้าที่สำคัญคือ คอยกรองแสงสีฟ้า ซึ่งเป็นอันตรายต่อจอประสาทตา และเป็นแสงที่หลีกเลี่ยงได้ยากเพราะมีอยู่ทั่วไปรอบๆตัวเรา ทั้งแสงจากดวงอาทิตย์ แสงจากโทรทัศน์ แสงจากจอคอมพิวเตอร์ แสงจากหลอดไฟ เป็นต้น

นอกจากนี้ลูทีนยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในดวงตาของคนเราอีกด้วย เพราะดวงตาของเราจะมีสารอนุมูลอิสระอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะเป็นตัวทำลายเซลล์รับภาพและทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับจอประสาทตาทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ได้

นอกจากลูทีนจะพบมากในดวงตาของคนเราแล้ว ยังพบได้ในสมองในส่วนที่เกี่ยวกับการมองเห็นถึงร้อยละ 66 จึงเชื่อว่าลูทีนมีส่วนช่วยในการรับภาพและส่งต่อไปยังสมองได้ดีขึ้นอีกด้วย

หน้าที่ของลูทีนในการปกป้องดวงตา คือ

1. ป้องกันและชะลอโรคจอประสาทตาเสื่อม โดยเข้าไปดูแลบริเวณจุดรับภาพของดวงตา (Macula) จากการศึกษาพบว่า การรับประทานลูทีนอย่างน้อยวันละ 5 มิลลิกรัม สามารถลด

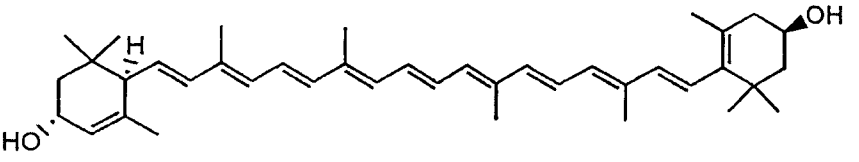
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเสี่ยงของโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

2. ปกป้องอนุมูลอิสระและกรองแสงที่จะมาทำลายดวงตา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคจอประสาทตาเสื่อม

3. ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดบริเวณดวงตา

4. ป้องกันและลดอาการของโรคต้อกระจก[17]



34

สรรพคุณทางยา :

ใบ มีสรรพคุณพอกแผลฝี ทาแผลเน่าเปื่อย น้ำคั้นจากใบแก้ปวดหู

ดอก แก้ริดสีดวงทวาร ขับเสมหะแก้เจ็บตา เวียนศีรษะ ไอกรน คางทูม

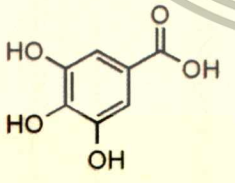
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cetkovic และคณะ[18] ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรือง *Calendula arvensis L.* (GWM) ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า และดอกดาวเรือง *C. officinalis L.* (CM) ซึ่งเป็นพันธ์ปลูก โดยการนำสารสกัดหยาบเมทานอลและน้ำของดอกดาวเรือง ในช่วงความเข้มข้นของ 0.10-0.90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), hydroxyl radical และ lipid peroxyl radical ด้วยกระบวนการ Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy พบว่าสารสกัด CM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัด GMW ขณะที่สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารสกัดจากชั้นน้ำ โดยสารสกัดชั้นน้ำของ CM มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เนื่องจากสารสกัด 0.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) ได้อย่างสมบูรณ์ ในระบบเฟนตอน (Fenton system) และที่ความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดนี้สามารถกำจัด DPPH ได้ 92 เปอร์เซ็นต์ และอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี (peroxyl radical) ได้ 95 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงที่เกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (14.49-57.47 มิลลิกรัม/กรัม) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (5.26-18.62 มิลลิกรัม/กรัม) ที่มีอยู่ในสารสกัด

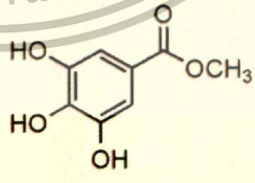
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.4 *C. arvensis* L. (GWM) และ *C. officinalis* L. (CM)

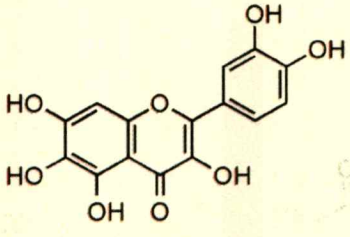
Gong และคณะ[19] ได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดดอกดาวเรืองด้วยแอลกอฮอล์หลายชนิด พบว่าตัวทำละลายที่หลากหลายมีแนวโน้มที่ทำให้ได้ปริมาณของโพลีฟีนอลจากสารสกัดหยาบของดอกดาวเรืองที่ไร้ไขมันแตกต่างกัน โดยชั้นสารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์ (เอทานอล) / น้ำ (7:3, v/v) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ 62.33 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง (GAE/g) และ 97.00 มิลลิกรัมสมมูลรูทิน/กรัมน้ำหนักแห้ง (RE/g) และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้ 2,2′-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) จากนั้นวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay พบว่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ (R^2 >0.900) และองค์ประกอบจากสารสกัดหยาบที่ได้จากการรวมกันของ HPLC–ABTS•+ post-column assay และ HPLC-DAD–MS method พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ Gallic acid **35**, gallicin **36**, quercetagetin **37**, 6-hydroxykaempferol-O-hexoside **38**, patuletin-O-hexoside **39** และ quercetin **40** โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ quercetagetin **37**



35

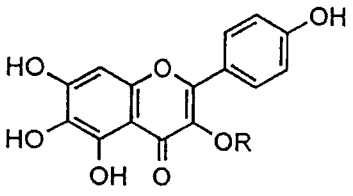


36

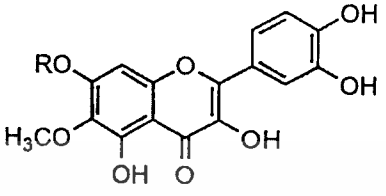


37

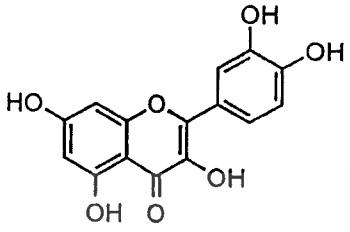
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



38

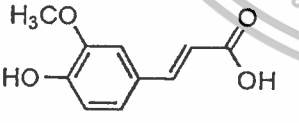


39

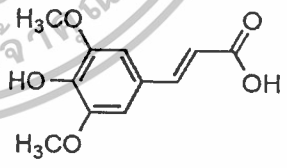


40

Kaisoon และคณะ[20] ได้ทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของดอกไม้ 12 ชนิดจากประเทศไทยที่สามารถนำมาบริโภคและใช้เป็นส่วนผสมในการปรุงอาหาร ซึ่งพบว่าขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด (TPC) เทียบเท่ากรดแกลลิก (GAE) 88 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนดาวเรือง (*T. erecta*) มีปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid) รวมสูงสุด (TFC) 68.9 mg มิลลิกรัมสมมูลรูทิน/กรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้พวงชมพู (*Antigonon leptopus*) และดาวเรือง (*T. erecta*) ยังพบสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงที่สุดซึ่งวัดโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay คือ 62.0 และ 60 มิลลิโมลสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟต/100 กรัมน้ำหนักแห้ง (mmol $FeSO_4$ /100 g) โดยสารประกอบกรดฟีนอลที่สำคัญนี้เป็น gallic acid 35, ferulic acid 41 และ sinapic acid 42 ขณะที่มีฟลาโวนอยด์มากกว่า quercetin 40 และ rutin 34 ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าดอกไม้ที่สามารถบริโภคได้เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระ



41

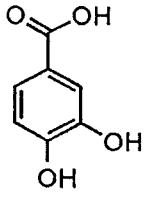


42

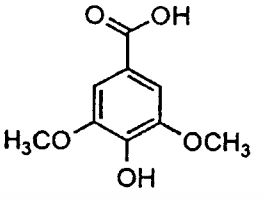
Siriamornpun และคณะ[21] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีน, เบต้าแคโรทีน, ลูทีน) ของดอกดาวเรืองที่เป็นผลมาจากกระบวนการอบแห้งที่แตกต่างกันคือ การตากแห้ง (FD) การอบแห้งด้วยลมร้อน (HA) และการใช้รังสีอินฟราเรดย่านไกล (far-infrared) ร่วมกับการหมุนเวียนอากาศร้อน (FIR-HA) เมื่อศึกษาสีของแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีน, เบต้าแคโรทีน, ลูทีน) และสารประกอบฟีนอลของสารสกัดหยาบดาวเรือง พบว่าการทำให้แห้งด้วย FIR-HA มีการเปลี่ยนแปลงสีของดาวเรืองน้อยกว่าวิธีการ FD และ HA นั้นคือวิธีการในการอบแห้งที่แตกต่างกันส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ โดย HA ให้ปริมาณของเบตาแคโรทีนสูงสุด (15.5 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

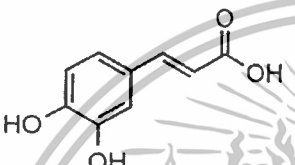
ในขณะที่ FIR-HA และ FD ให้ปริมาณลูทีน (lutein) และไลโคปีน (lycopene) สูงสุด ส่วนกรดฟีนอลที่สำคัญของดอกดาวเรืองคือ *p*-coumaric acid, ferulic acid และ sinapic acid โดยพบว่ามี gallic acid, protocatechuic acid **43**, syringic acid **44**, caffeic acid **45**, และ *p*-coumaric acid **46** ในปริมาณสูงหลังจากผ่านกระบวนการ FIR-HA แสดงให้เห็นว่า FIR-HA เป็นวิธีการอบแห้งดาวเรืองที่เหมาะสมเพื่อใช้รักษาสี คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพ



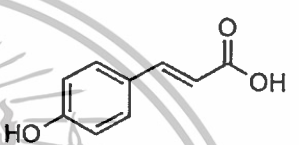
43



44



45



46

Hossain และคณะ[22] ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอินทรีย์ต่างๆ จากใบของพืชเขตร้อน คือ Tetrastigma (เถาองุ่นป่า) จากซาบาห์ โดยการนำใบแห้งของ Tetrastigma มาบดละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ เฮกเซน เอทิล แอซิเตต คลอโรฟอร์ม บิวทานอล และเมทานอล แล้วนำน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอินทรีย์ชั้นต่างๆ ที่ได้คือ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิล แอซิเตต ชั้นคลอโรฟอร์ม ชั้นบิวทานอลและชั้นเมทานอลไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic contents) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ 2,2-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงสุด คือ 386.22 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสารสกัดหยาบชั้นเอทิล แอซิเตต ชั้นคลอโรฟอร์ม ชั้นเฮกเซน และชั้นบิวทานอล คือ 190.89, 175.89, 173.44 และ 131.72 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนน้ำมันหอมระเหยไม่พบสารประกอบฟีนอล ผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐานพบว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ สารสกัดหยาบเมทานอล > สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต > สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม > สารสกัดหยาบบิวทานอล > สารสกัดหยาบเฮกเซน และน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลในการต้านออกซิเดชัน ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดทั้งหมดสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดนั้น โดยใบของ Tetrastigma ที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลอาจจะเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง

ดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) ที่มีระยะเวลาการปลูก 45 วัน เก็บจากแปลงเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3.2 สารเคมีและสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นำมาใช้ในการสกัดและการทำโครมาโทกราฟีได้แก่เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และเมทานอล จะถูกนำมากลั่นที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

การจัดกลุ่มสารสำคัญและการแยกสารให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคือ คอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลของ Scharlau GE0048 ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร และใช้ซิลิกาเจลของ CARLO ERBA ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร สำหรับคลุกสารสกัดหยาบหรือสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ใช้ซิลิกาเจล 60 F_{254} บนแผ่นอะลูมิเนียม จุดของสารสำคัญพิสูจน์ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร) และใช้รีเอเจนต์ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับสารสำคัญได้แก่ anisaldehyde reagent และ vanillin reagent ป้ายบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นนำความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

สเปกตรัม ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ถูกบันทึกด้วยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ที่ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ท การเตรียมตัวอย่างทำโดยละลายสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย CD_3OD สเปกตรัมสเปกตรัม ^{1}H NMR จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณโปรตอนของ CD_3OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{13}C NMR ปรากฏตำแหน่งสัญญาณของคาร์บอน ที่ δ 49.00 ppm ตามลำดับ

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เก็บตัวอย่างดอกดาวเรืองโดยคัดเลือกดอกที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ ไม่มีโรคและแมลงรบกวน ล้างด้วยน้ำ ผึ่งลมแล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง และนำมาบดให้ละเอียด

2. นำดอกดาวเรือง 500 กรัม แช่ด้วยเมทานอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ทำการคนของผสมทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

3. กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ได้ของเหลวผลกรองชั้นเมทานอล จากนั้นระเหยเมทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

4. ส่วนกากนำมาแช่ด้วยเมทานอลเมื่อครบ 7 วัน ทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. จัดกลุ่มสารสำคัญโดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.1)

6. ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดของตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล ตามลำดับ

7. นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นมาหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

8. นำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพที่สุด มาแยกสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

9. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

10. นำสารบริสุทธิ์มาตรวจสอบหาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี

3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดหยาบจากดอกดาวเรือง เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Javanmardi และคณะ[3] ทำโดยเตรียมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu's reagent (ของผสมระหว่าง phosphomolybdate และ phosphotungsta) เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที วัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ดำเนินการทดลองวิธีการทดลองละ 3 ซ้ำ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดถูกรายงานเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ 1 กรัม (mg GAE/g dw)

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกดาวเรือง[3]

การศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันในการรวมตัวกับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเชื่อถือได้ เพราะอนุมูล DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระเสถียรในรูปสารละลาย ในการทดสอบนี้จะใช้สารละลายสีม่วงเข้มของ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันที่มีปะปนอยู่ในสารสกัดหยาบของดอกดาวเรืองในระยะเวลาที่กำหนด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน

ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH สังเกตได้จากการสีของสารละลายจางลงซึ่งจะบ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชัน ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้

1. เตรียมสารสกัดดอกดาวเรืองที่ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563 และ 0.0781 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารสกัดดอกดาวเรือง ในข้อ 1

3. เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.0045 กรัม/100 มิลลิลิตร ในเมทานอล

4. นำสารสกัดดอกดาวเรืองที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน 96 well microplate ปริมาตร 3.35 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดำเนินการทดลองวิธีการทดลองละ 3 ซ้ำ

5. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดดอกดาวเรืองกับค่าการดูดกลืนแสงแล้วหาค่า EC_{50} จากกราฟที่แสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

7. ใช้ค่า EC_{50}ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันระหว่างสารสกัดดอกดาวเรืองกับสารมาตรฐาน BHT

3.6 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เมื่อวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ นำสารสกัดหยาบในชั้นที่ให้ผลการทดสอบต้านออกซิเดชันดีที่สุดมาแยกออกเป็นสารส่วนย่อย โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีมีวิธีการดังนี้

1. แบ่งสารสกัดหยาบมาหาระบบตัวทำละลายในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) พบว่าการแยกของสารชัดเจนที่สุด และเก็บสารสกัดหยาบชั้นนี้ไว้สำหรับเทียบ TLC ของสารส่วนย่อยในการแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

2. ทำการตัดแผ่น TLC ขนาด 2 × 5 เซนติเมตร จากนั้นทำการขีดเส้นจากปลายขอบบนและขอบล่างของแผ่น TLC (เพื่อหาระยะทางที่ตัวทำละลายพาสารที่ต้องการแยกไป) จากนั้นทำการจุดสารที่ได้จากสารสกัดหยาบที่แยกได้หลังทำการระเหยตัวทำละลายออก แล้วแบ่งออกมาใส่ในขวดเก็บสาร และทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC

3. เตรียม TLC แท็งค์ โดยทำให้ในแท็งค์อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้กระดาษกรองวางไว้ด้านในแท็งค์ และปิดด้วยกระจก

4. ทำการทดสอบอัตราส่วนของสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายที่มีขั้วต่างกันในอัตราส่วน 1:90 จากนั้นวางแผ่น TLC ลงใน TLC แท็งค์ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงเส้นด้านบนที่ขีดไว้ ถ้าสารแยกออกจากกันได้ดีจะพบการแยกของสารเกิดขึ้นเป็นจุดที่ชัดเจน ถ้าไม่พบเป็นจุดชัดเจนให้ทำการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของตัวทำละลายในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสาร

5. นำแผ่น TLC มาทดสอบการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นทำการวงจุดที่เห็นเป็นสารเรืองแสง

6. ป้ายรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสีเฉพาะตัว (anisaldehyde reagent หรือ vanillin reagent) ให้ทั่วทั้งแผ่น TLC แล้วนำไปวางบนแผ่นให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีในบริเวณที่เราได้วงไว้ ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เมื่อได้อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม นำมาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

3.7 การเตรียมคอลัมน์และการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยใช้ซิลิกาเจล ขนาด 0.04-0.06 มิลลิเมตร ทำให้เป็นของเหลวข้นในตัวทำละลาย

2. ใช้สำลีที่ชุ่มด้วยตัวทำละลายอุดที่ปลายคอลัมน์ เทซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์

3. ทำการปรับผิวหน้าของซิลิกาเจลให้เรียบและแน่น ทำการป้องกันพื้นผิวด้านบนของซิลิกาเจลด้วยทราย

4. ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ ละลายด้วยตัวทำละลายลงไปเล็กน้อย จากนั้นใส่ซิลิกาเจลขนาด 0.06 -0.20 มิลลิเมตร คลุกให้เข้ากัน ทำการระเหยตัวทำละลายออกให้หมดและเทใส่ลงในคอลัมน์

5. ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์จากนั้นทำการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายทีละน้อยอย่างต่อเนื่องเพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

6. เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ ตรวจสอบสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พร้อมทำการตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วทดสอบด้วย anisaldehyde reagent และ vanillin reagent

7. จัดกลุ่มสารโดยรวมสารส่วนย่อยให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยพิจารณาจากแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

3.8 การแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์ตามวิธีในหัวข้อ 3.7

2. นำสารสกัดหยาบที่ผสมกับซิลกาเจลลงในคอลัมน์โดยไม่ต้องทำการกลั้วขวดก้นกลม ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ประมาณ 700 มิลลิลิตร เป็นตัวชะ จากนั้นทำการเพิ่มขั้วตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องด้วยเอทิลแอซิเตต เพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

3. เริ่มเก็บสารที่ถูกชะอยู่ห่างจากปลายคอลัมน์ประมาณ 5 เซนติเมตร โดยเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วยขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นจดหมายเลขพร้อมกับทำการตรวจสอบสารในแต่ละขวดด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) ทำการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายและทำการตรวจสอบด้วยการส่องแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วทดสอบด้วย anisaldehyde reagent และ vanillin reagent

4. เมื่อสารที่ต้องการแยกออกมาให้ทำการจดบันทึกว่า เริ่มออกจากขวดที่เท่าใดและจำนวนเท่าใด รวมสารที่แยกด้วยแผ่น TLC ถ้าสารออกมาเหมือนกันให้ทำการรวมสารละลายที่แยกออกมาได้เข้าด้วยกันแล้วทดสอบ TLC อีกครั้งจึงระเหยตัวทำละลายออก

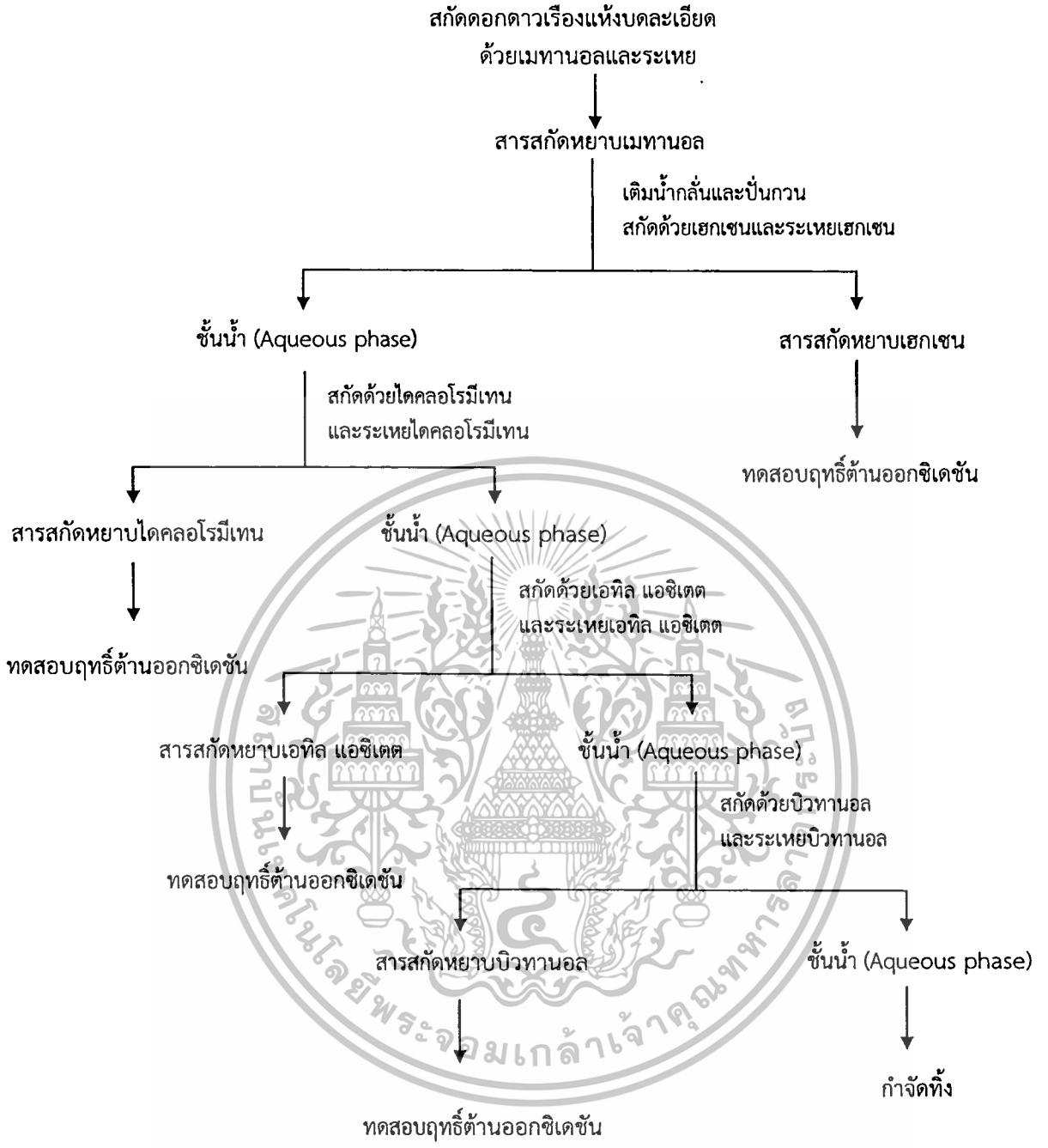
5. การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ดำเนินกรรมวิธีตามข้อ 3.6 และ 3.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การหาส่วนประกอบทางเคมีของดอกดาวเรือง

การหาส่วนประกอบทางเคมีของดอกดาวเรืองจะดำเนินการทดลองด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำใช้ดอกดาวเรืองแห้ง น้ำหนัก 100 กรัม และนำมาวิเคราะห์หาสารด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี (GC:Agilent Technologies Model 6890N, MS:Agilent Techologies Model 7683) ใช้คอลัมน์ DB-Wax วิเคราะห์ด้วยการคำนวณร้อยละขององค์ประกอบด้วยพื้นที่ใต้พีค FID (Flame Ionization Detector Peak)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี Solvent Partitioning Extraction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

งานวิจัยนี้เตรียมสารสกัดจากดอกดาวเรืองด้วยวิธีการหมัก (Maceration) โดยใช้ดอกดาวเรืองแห้งบดละเอียด น้ำหนักเท่ากับ 500.0 กรัม แช่ในเมทานอล กรองแยกกากและของเหลวผลกรอง จากนั้นทำการระเหยเมทานอลออกได้สารสกัดหยาบเมทานอลของดอกดาวเรือง (320.9 กรัม) มีลักษณะของเหลวหนืดเกือบสีเหลืองเข้ม และผลได้ร้อยละคิดเป็น 64.18 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของดอกดาวเรืองแห้ง จากนั้นทำการจัดกลุ่มสารสำคัญโดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลน้ำหนัก 219.00 กรัม มาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ และทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบ 4 ชนิดคือ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล น้ำหนักเท่ากับ 8.13, 1.44, 8.86 และ 12.13 กรัม และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 3.17, 0.66, 4.04 และ 5.54 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) สารสกัดหยาบทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพื่อหาสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุดและนำไปแยกหาสารต้านออกซิเดชันในรูปสารบริสุทธิ์

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักสารสกัดและผลได้เป็นร้อยละ

สารสกัดหยาบ	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
เฮกเซน	8.13	3.17
ไดคลอโรมีเทน	1.44	0.66
เอทิล แอซิเตต	8.86	4.04
บิวทานอล	12.13	5.54

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีประสิทธิภาพและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าสารธรรมชาติในกลุ่มอื่นๆ โดยความสามารถในการต้านออกซิเดชันจะขึ้นกับปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดนั้น[23] การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบของดอกดาวเรืองจึงเป็นการทดสอบในขั้นตอนแรกโดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิคในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/น้ำหนักแห้งของสารสกัด พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมทานอล สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล มีค่าเท่ากับ 38.389, 7.177, 41.122, 122.388, และ 50.558 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด คือ122.388 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด กล่าวได้ว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัดส่งผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีขั้วประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ในโครงสร้างจึงเกิดการละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน อย่างเช่น เอทิล แอซิเตต ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shyu และคณะ[24] ใช้วิธีการสกัดสารแอนติออกซิเดชันจากดอก Dill (*Anethum graveolens* L.) โดยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (solvent-solvent partition) ได้กล่าวสรุปกลุ่มสารในชั้นสารสกัดหยาบกล่าวคือ สารสกัดหยาบเฮกเซนมีองค์ประกอบคือกลุ่มสารที่ไม่มีขั้วได้แก่กลุ่มไขมันและคลอโรฟิลล์ สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลาง สามารถสกัดสารกลุ่มพอลิฟีนอลที่ไม่มีสี (non-coloured polyphenols) และฟลาโวนอยด์ อะไกโคน (flavonoid aglycones)[25]

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

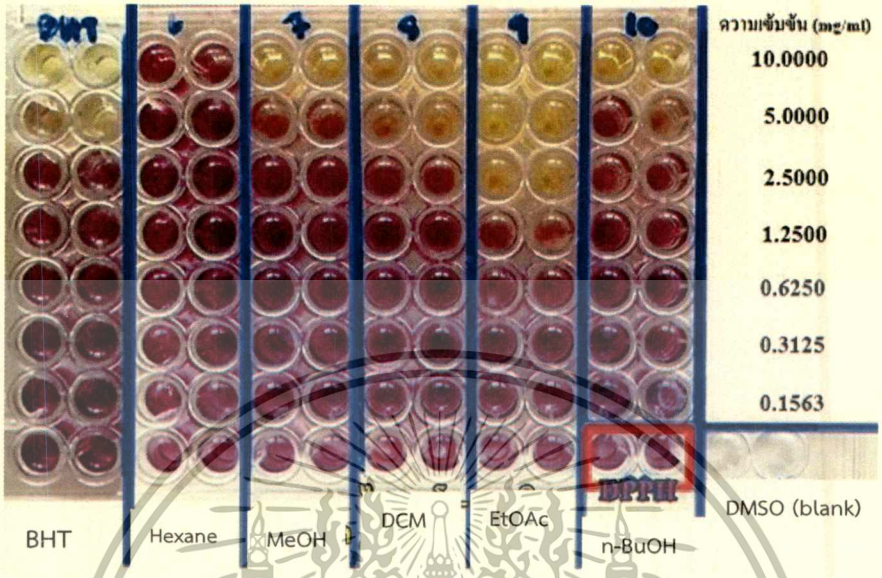
สารสกัดหยาบ	ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด/มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก)
เมทานอล	38.389
เฮกเซน	7.177
ไดคลอโรมีเทน	41.122
เอทิล แอซิเตต	122.388
บิวทานอล	50.558

4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบดอกดาวเรืองด้วยวิธี DPPH

การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันโดยการรวมตัวกับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอลทำได้โดยอาศัยการจับกับอิเล็กตรอนของอนุมูลอิสระ DPPH แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ DPPH ที่มีความคงตัว ทำให้สารละลาย DPPH เปลี่ยนสีจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง และทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตรลดลง สารสกัดหยาบใดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระหรือสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีจะทำให้สารละลายสีม่วงแดงของ DPPH จางลงได้มากกว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อย เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น ทำให้มีปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นด้วย สีม่วงเข้มของสารละลาย DPPH จึงจางลงมากขึ้น โดยเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ คือ Butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐานและ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุม รายงานผลเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณหรือความเข้มข้นสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% จากภาพที่ 4.1 สีของสารละลาย DPPH ผสมกับสารสกัดหยาบเฮกเซน มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH น้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งพบว่าสารสกัดเฮกเซนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 7.177 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอล สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน และสารสกัดหยาบบิวทานอลมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH ปานกลาง ในขณะที่สีของสารละลาย DPPH ผสมกับสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH มากที่สุดโดยปรากฏหลุมของสารละลายที่เปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสารละลายสีเหลืองมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลุมของสารสกัดหยาบอื่นๆ และเมื่อพิจารณาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจะมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 122.388 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด



ภาพที่ 4.1 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบเมทานอล ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ 36.0, 30.0, 8.1 และ 28.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ DMSO เป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 4.3 ค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

สารสกัดหยาบ	EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เมทานอล	36.0
เฮกเซน	Inactive
ไดคลอโรมีเทน	30.0
เอทิล แอซิเตต	8.1
บิวทานอล	28.5

BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แสดงว่าสารต้านออกซิเดชันเป็นสารประกอบที่มีขั้ว เฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วจึงไม่สามารถสกัดสารต้านออกซิเดชันออกมาได้ ส่วนไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล จัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลางจึงสามารถสกัดสารออกซิเดชันออกมาได้ จากงานวิจัยนี้พบว่าส่วนเอทิล แอซิเตตเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง ด้วยเหตุนี้สารสกัดหยาบเอทิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอซิเตตจึงให้ค่า EC_{50} มีค่าต่ำกว่าสารสกัดหยาบอื่นๆ แสดงถึงการมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดหยาบอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ทดสอบได้ แสดงให้เห็นถึงผลจากการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัด ทำให้ปริมาณและความหลากหลายของสารต้านออกซิเดชันแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ (ความเป็นขั้ว) ของสารต้านออกซิเดชันนั้น

4.4 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล พบว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด การทดลองขั้นต่อไปเป็นการนำสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมาแยกสารต้านออกซิเดชันในรูปสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะสารต้านออกซิเดชันโดยอาศัยหลักการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม และจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยพิจารณาจากการดูดกลืนแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเหมือนและ/หรือต่างกันของการเกิดสีขององค์ประกอบของสารในสารสกัดหยาบที่ปรากฏบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟีเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent และ vanillin reagent รวมจุดสีที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน และทำการระเหยตัวทำละลายออก จากการทดลองนำสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต 6.00 กรัม มาแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยการเปลี่ยนอัตราส่วนความมีขั้วของตัวชะสารระหว่างเฮกเซนกับเอทิล แอซิเตต และจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี สามารถแยกส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบได้ทั้งหมด 7 ส่วนย่อย (F_1-F_7) อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนและเอทิล แอซิเตต น้ำหนักของสารส่วนย่อย (F_1-F_7) และผลได้คิดเป็นร้อยละ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การแยกสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต

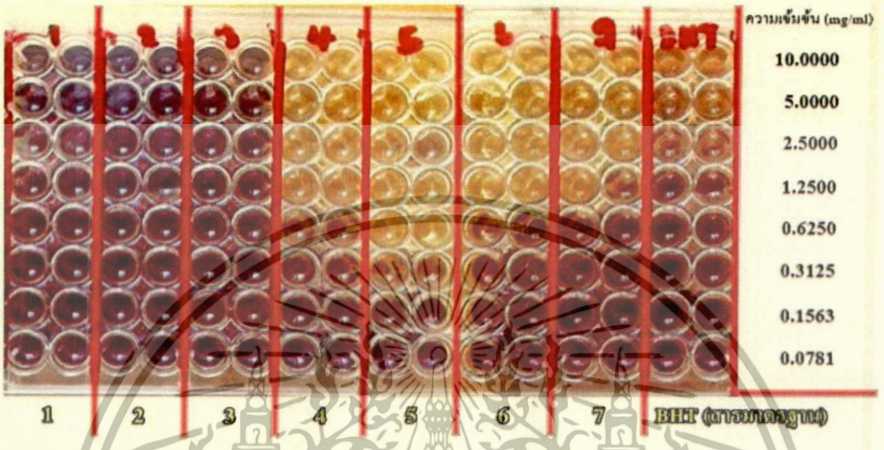
สารส่วนย่อย	อัตราส่วนระหว่างเฮกเซน:เอทิล แอซิเตต	น้ำหนักสารส่วนย่อย (มิลลิกรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
F_1	98:2	5.0	0.08
F_2	70:30	54.5	0.91
F_3	55:45	10.1	0.17
F_4	45:55	801.9	13.36
F_5	25:75	1047.6	17.46
F_6	0:100	3622.8	60.38
F_7	0:100	214.5	3.57

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7 ด้วยวิธี DPPH

การทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7 โดยการรวมตัวกับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ DMSO เป็นชุดควบคุม พบว่าสีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันในสารส่วนย่อย F_1-F_7 (ภาพที่ 4.2) พบว่าสีของสารละลาย DPPH ที่ผสมกับสารส่วนย่อย F_1, F_2 และ F_3 ไม่มีการเปลี่ยน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารส่วนย่อย F_1, F_2 และ F_3 ไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ในขณะที่สีของสารละลาย DPPH ที่ผสมกับสารส่วนย่อย F_4, F_5, F_6 และ F_7 มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH โดยจะเห็นสีของสารละลาย DPPH จางลงจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลืองอย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.2 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7

เมื่อพิจารณาค่า EC_{50} ดังแสดงในตาราง 4.5 พบว่าสารส่วนย่อยสารส่วนย่อย F_4, F_5, F_6 และ F_7 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.8, 3.0, 5.4 และ 9.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารส่วนย่อย F_5 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงการมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุด

ตารางที่ 4.5 ค่า EC_{50} ของสารส่วนย่อย F_1-F_7

สารส่วนย่อย	EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
F_1	Inactive
F_2	Inactive
F_3	Inactive
F_4	5.8
F_5	3.0
F_6	5.4
F_7	9.0

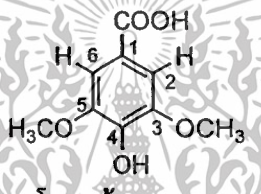
BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7 จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต พบว่าสารส่วนย่อย F_5 มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุด และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารส่วนย่อย F_4 และ F_6 ให้ประสิทธิภาพรองลงมา ทั้งนี้เป็นผลมาจากการใช้อัตราส่วนตัวทำละลายระหว่างเฮกเซนกับเอทิล แอซิเตตที่แตกต่างกันเพื่อเพิ่มความมีขั้ว ทำให้ปริมาณและความหลากหลายของสารต้านออกซิเดชันแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสมบัติความมีขั้วของสารต้านออกซิเดชันนั้นๆ สารส่วนย่อย F_4 (267.9 มิลลิกรัม) ถูกนำมาแยกสารต้านออกซิเดชันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_4 ถูกชะจากคอลัมน์เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลเท่ากับ 98:2 มีค่า R_f เท่ากับ 0.53 ในระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน:เมทานอลเท่ากับ 99:1 ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ไม่ให้สีบนแผ่น TLC เมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent น้ำหนักสารบริสุทธิ์เท่ากับ 229.4 มิลลิกรัม คิดเป็นผลได้ร้อยละคิดเป็น 85.62 มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี ข้อมูลจาก ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรา พบว่าจาก ^{1}H NMR (CD_3OD, 300 MHz) มีค่า δ เท่ากับ 3.88 (-OC<u>H</u>$_3$, 6H) และ 7.32 ppm (H-2 และ H-6, 2H) และ ^{13}C NMR มีค่า δ เท่ากับ 168.88 (-<u>C</u>OOH), 147.97 (C-3 และ C-5), 141.11 (C-4), 121.28 (C-1) และ 56.12 (-O<u>C</u>H$_3$) สารบริสุทธิ์คือ syringic acid มีสูตรโครงสร้างแสดงในภาพที่ 4.3 ซึ่งมีข้อมูลสอดคล้องกับข้อมูลรายงานวิจัยของ Yin และคณะ[26]



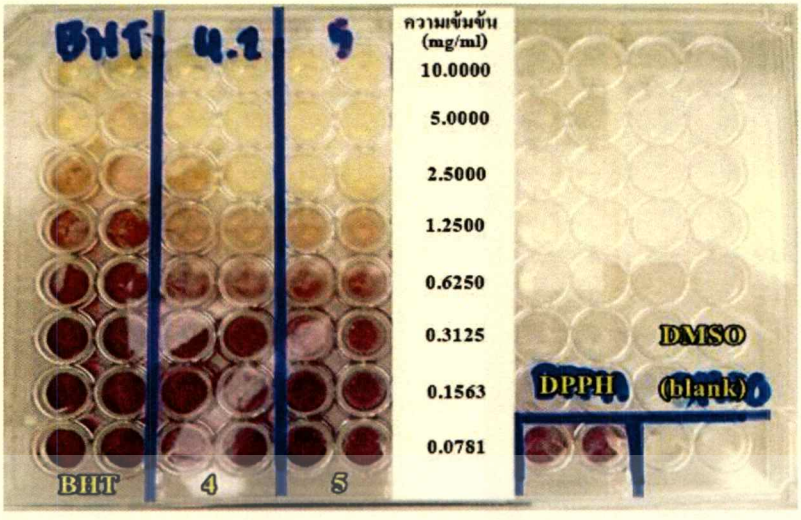
ภาพที่ 4.3 โครงสร้างของ syringic acid

และเมื่อนำสารส่วนย่อย F_5 น้ำหนักเท่ากับ 601.0 มิลลิกรัม พบว่าสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_5 ถูกชะจากคอลัมน์เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนและเอทิล แอซิเตต เท่ากับ 50:50 มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 ในระบบตัวทำละลายเฮกเซน:เอทิล แอซิเตตเท่ากับ 20:80 ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้จุดสีเหลืองเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent และ vanillin reagent น้ำหนักสารบริสุทธิ์เท่ากับ 405.6 มิลลิกรัม คิดเป็นผลได้ร้อยละคิดเป็น 90.82

4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี DPPH

การทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตโดยการรวมตัวกับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอลพบว่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT พบว่าสีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 คือ syringic acid แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่า syringic acid มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH โดยจะเห็นสีของสารละลาย DPPH จางลงจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลืองอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5

และเมื่อพิจารณาค่า EC_{50} ของ syringic acid พบว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร syringic acid มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารละลายมาตรฐาน BHT แต่เมื่อเทียบกับสารส่วนย่อย F_4 เห็นได้จากค่า EC_{50} ที่เพิ่มขึ้นจากเดิม 5.8 เป็น 7.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บอกถึง syringic acid มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าสารส่วนย่อย F_4 ซึ่งอธิบายได้คือสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพมากกว่านั้นมีขั้วสูงจึงสามารถติดอยู่กับซิลิกาเจลที่มีขั้วสูงได้เหมือนกัน ทำให้สารไม่ถูกชะออกจากคอลัมน์โดยตัวทำละลายได้จึงทำให้เกิดการออกฤทธิ์เสริมกัน (Synergistic phenomenon) ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ syringic acid จากส่วนย่อย F_4 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ลดลง

ส่วนสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_5 พบว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.8 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของดอกดาวเรืองด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometer

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของดอกดาวเรืองแบ่งออกเป็นสองแนวทางได้แก่แนวทางที่หนึ่งเป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันดอกดาวเรือง และวิธีที่สองเป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ ทั้งสองวิธีจะถูกวิเคราะห์ผลด้วยด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometer ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

4.8.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันดอกดาวเรือง

ดอกดาวเรืองแห้งน้ำหนัก 100 กรัม ถูกนำมากลั่นน้ำมันดอกดาวเรืองด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (Hydro-distillation) ได้น้ำมันดอกดาวเรืองสีเหลืองมีผลได้ร้อยละเท่ากับ 0.25% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เปรียบเทียบกับน้ำหนักดอกดาวเรืองแห้ง องค์ประกอบทางเคมีวิเคราะห์ผลจากการวัดสัดส่วนมวลต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประจุและเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time) พิจารณาผลที่ได้เทียบกับข้อมูลจากฐานข้อมูล Wiley7n data system และเอกสารอ้างอิง จากการทดลองพบว่า น้ำมันดอกดาวเรืองประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด 27 ชนิด (ตารางที่ 4.6) โดยมีองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยดังนี้ Linalool (4.4%), α-Terpinenol (1.9%), Caryophyllene (17.4%), Germacrene-D (1.1%), Spathulenol (1.2%), Caryophyllene oxide (2.6%) และ 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone (2.4%)

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันดอกดาวเรือง

สารประกอบ	Retention time	(%)
Linalool	7.929	4.4
α-Terpinenol	9.353	1.9
Geraniol	9.844	0.4
Piperitone	10.292	0.5
Caryophyllene	12.629	17.4
Germacrene-D	13.389	1.1
Germacrene-B	13.578	0.4
Spathulenol	14.581	1.2
Caryophyllene oxide	14.668	2.6
α-Cardinol	15.450	0.3
Caryophyllenol	15.488	0.3
6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	17.587	2.4

4.8.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบดอกดาวเรืองพบว่า สารสกัดหยาบเฮกเซนประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย 2-isopropyl-5-methyl-3-cyclohexen-1-one กรดไขมันได้แก่ palmitic acid และ linoleic acid และเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ได้แก่ 2-methyl palmitate, methyl linolelate และ methyl isostearate, และสารประกอบไทโอฟีน α-terthienyl ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเฮกเซน

สารประกอบ	RT	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	ไอออนย่อย (มวล/ประจุ)
2-Isopropyl-5-methyl-3-cyclohexen-1-one	10.29	$C_{10}H_{16}O$	152	152, 137, 110, 95, 82 ,54
Methyl palmitate	18.83	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270, 239, 227, 143, 87, 74, 55, 43
Palmitic acid	19.43	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256, 227, 213, 185, 171, 157, 129, 115, 97, 83, 73, 60, 43
Methyl linolelate	22.55	$C_{19}H_{34}O_2$	294	294, 263, 220, 164, 150, 109, 95, 81, 67, 55, 41
Methyl isostearate	23.26	$C_{19}H_{38}O_2$	298	298, 267, 255, 199, 143, 97, 87, 74, 67, 55, 43
Linoleic acid	23.34	$C_{18}H_{32}O_2$	280	280, 150, 136, 95, 81, 67, 55, 41
α-terthienyl	25.22	$C_{12}H_8S_3$	248	248, 203, 171, 127, 69, 45

จากตารางที่ 4.8 แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนสายโซ่ยาว *n*-Nonacosane จัดเป็น plant wax paraffin กรดไขมันได้แก่ Palmitic acid เมทิลเอสเทอร์ของกรด 3-acetoxy-3-hydroxypropanoic และ pyroglutamic ได้แก่ methyl 3-acetoxy-3-hydroxypropanoate และ methyl pyroglutamate กลุ่มแลคโตน ได้แก่ Loliolide และกรดอินทรีย์ได้แก่ Syringic acid นอกจากนั้นผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต ประกอบด้วย Syringic acid เป็นองค์ประกอบหลัก

ตารางที่ 4.8 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน

สารประกอบ	RT	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	ไอออนย่อย (มวล/ประจุ)
Methyl 3-acetoxy-3-hydroxypropanoate	8.32	$C_6H_{10}O_5$	162	162, 131, 103, 71, 61, 43
Methyl pyroglutamate	11.86	$C_6H_9NO_3$	143	143, 84, 56, 41
Loliolide	16.73	$C_{11}H_{16}O_3$	196	196, 178, 163, 153, 140, 135, 111, 105, 95, 81, 67, 51, 43
Syringic acid	17.20	$C_9H_{10}O_5$	198	198, 183, 155, 127, 109, 93, 53, 39
Palmitic acid	19.69	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256, 213, 185, 171, 157, 129, 115, 97, 83, 73, 60, 43
n-Nonacosane	25.33	$C_{29}H_{60}$	408	408, 127, 113, 99, 85, 71, 57, 43

และตารางที่ 4.9 แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบบิวทานอล ประกอบด้วย 2-Penten-1-ol, 2-Ethyl-2-methyl-1,3-oxathiolane, Syringic acid, Myristic acid และ 2-Methyl-benzothiazole

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบบิวทานอล

สารประกอบ	RT	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	ไอออนย่อย (มวล/ประจุ)
2-Penten-1-ol	12.50	$C_5H_{10}O$	86	86, 77, 73, 69, 57, 44, 41, 39
2-Ethyl-2-methyl-1,3-oxathiolane	14.84	$C_6H_{12}OS$	132	132, 117, 103, 60, 57, 43
Syringic acid	17.20	$C_9H_{10}O_5$	198	198, 183, 155, 127, 109, 93, 53, 39
Myristic acid	19.42	$C_{14}H_{28}O_2$	228	228, 199, 185, 129, 97, 73, 43
2-Methyl-benzothiazole	19.62	C_8H_7NS	149	149, 93, 69, 57, 41, 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากดอกดาวเรือง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสกัดและแยกสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง โดยนำกลีบดอกดาวเรืองแห้งมาสกัดด้วยวิธีการหมักในตัวทำละลายเมทานอล เตรียมสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลได้เท่ากับ 320.9 กรัม และผลได้ร้อยละคิดเป็น 64.18 เปรียบเทียบกับน้ำหนักดอกดาวเรืองแห้ง จากนั้นแบ่งสารสกัดหยาบเมทานอล 219.0 กรัม ทำการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ได้สารสกัดหยาบ 4 ชนิดคือสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดบิวทานอล มีน้ำหนักเท่ากับ 8.13, 1.44 8.86 และ 12.13 กรัม ตามลำดับ และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 3.71, 0.66, 4.04 และ 5.54 ตามลำดับ

5.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง พบว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 122.388 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีขั้วเนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันเช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อยู่ในโครงสร้างจึงเกิดการละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน ในงานวิจัยนี้พบว่าเอทิล แอซิเตตเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะสมที่สามารถใช้ในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง

5.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบดอกดาวเรืองด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบเมทานอล สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ DMSO เป็นชุดควบคุม พบว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตสามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดหยาบอื่น โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ปรากฏในสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตในปริมาณที่มากที่สุด

5.1.4 การแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบชั้นเอทิล แอซิเตต

สามารถแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายคือเฮกเซน: เอทิล แอซิเตต ได้สารส่วนย่อยทั้งหมด 7 ส่วนย่อยคือ F_1, F_2, F_3, F_4, F_5, F_6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ F_7 พบว่า สารส่วนย่อย F_4-F_6 มีปริมาณมากกว่าสารส่วนย่อย F_1-F_3 และ F_7 ผลได้ร้อยละของสารส่วนย่อย F_4, F_5 และ F_6 คิดเป็น 13.36, 17.46 และ 60.38 ตามลำดับ

5.1.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดส่วนย่อย F_1-F_7 ด้วยวิธี DPPH

เมื่อนำสารส่วนย่อย F_1-F_7 มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ DMSO เป็นชุดควบคุม พบว่าสารส่วนย่อย F_5 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารส่วนย่อย F_4 และ F_6 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.8 และ 5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงสารส่วนย่อย F_5 ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด และสารส่วนย่อย F_4 และ F_6 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรองลงมา ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของอัตราส่วนตัวทำละลายระหว่างเอทิล แอซิเตตกับเฮกเซนทำให้ความเป็นขั้วของตัวทำละลายแตกต่างกัน ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างเฮกเซนกับเอทิล แอซิเตตเท่ากับ 25:75 จึงเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับสารต้านออกซิเดชันมากที่มีปะปนอยู่ในสารส่วนย่อย F_5 มากที่สุด จึงสามารถละลายสารต้านออกซิเดชันออกมาได้มากกว่าอัตราส่วนอื่นของตัวทำละลายที่ใช้

5.1.6 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5

นำสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 น้ำหนักเท่ากับ 229.4 มิลลิกรัม และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 85.62 จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่าสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 คือ Syringic acid และสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_5 น้ำหนักเท่ากับ 405.6 กรัม และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 90.82

5.1.7 ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 ด้วยวิธี DPPH

การทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 โดยการรวมตัวกับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอล พบว่าสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 คือ Syringic acid จัดเป็นสารประกอบ phenolic acid ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของของ Rice-Evans และคณะ[27] ที่กล่าวถึง Total antioxidant activity ของ phenolic acid เรียงลำดับดังนี้ Gallic > *p*-Coumaric > Ferulic > Vanillic > Syringic > Caffeic > *m*-Coumaric > Protocatechuic > Gentisic > *o*-Coumaric > Salicyclic > *p*-Hydroxybenzoic และ Syringic acid มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_5 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บทสรุปของงานวิจัยฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารจากดอกดาวเรืองในประเทศไทยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Valyova และคณะ[28] รายงานถึงการประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของดอกดาวเรืองที่ปลูกในประเทศบัลกาเรียในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี DPPH และ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) พบว่าสารสกัดหยาบเอทิล แอซิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด จึงเป็นข้อยืนยันได้ว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรืองคือเอทิล แอซิเตตและองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันคือ Syringic acid ซึ่งพบเป็นสารประกอบหลักในดอกดาวเรือง

5.2 ข้อเสนอแนะ

นอกเหนือจากการพัฒนาดอกดาวเรืองในแง่ของการเป็นอาหารเสริมบำรุงสายตาเนื่องจากมีสารประกอบลูทีนในปริมาณที่สูง ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายในท้องตลาด ส่วนการพัฒนาดอกดาวเรืองในอีกแนวทางคืออุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากดอกดาวเรืองเป็นอีกแหล่งสำคัญของสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลงานวิจัย

สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

1. โปสเตอร์และรายงานการวิจัย:

การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Pure and Applied Chemistry International Conference 2012. (The 6th PACCON Chemistry in Food & Agricultural Science) วันที่ 11-13 มกราคม 2555 ณ โรงแรมเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่.

S. Phanrudeee, N. Choengchan and P. Charoenying. 2012. Method Development for Evaluation of Total Antioxidant Capacity of *Tagetes erecta* Linn. Flower Extract. In Proceeding: PACCON 2012 (Pure and Applied Chemistry International Conference 2012. pp. 820-823.

2. โปสเตอร์และบทคัดย่อ:

การประชุมวิชาการระดับชาติ 38th Congress on Science and Technology of Thailand 2012. วันที่ 17-19 ตุลาคม 2555 ณ โรงแรมเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่.

R. Poonrom, C. Laosinwattana and P. Charoenying. 2012. The Essential oil from *Tagetes erecta* Linn. Flower and Antioxidant Activity of Flower Extracts, C3_C0077.

3. รายงานการวิจัย:

การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 3rd International Symposium on Technology for Sustainability. 2013. 20-22 November 2013. Hong Kong Institute of Vocational Education (Tsing Yi), Hong Kong.

R. Poonrom, P. Arsa, S. Sangkatin, K. Traiprawat, C. Laosinwattana and P. Charoenying. 2013. Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Tagetes erecta* Linn. Flower in Thailand. In Proceeding: 3rd International Symposium on Technology for Sustainability. 2013. pp. 209-210.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FAS-P-044

METHOD DEVELOPMENT FOR EVALUATION OF TOTAL ANTI-OXIDANT CAPACITY OF *Tagetes erecta* Linn. FLOWER EXTRACT

Sontaya Phanrudee[1,*], Nathawut Choengchan[2], Patchanee Charoenying[1]

[1] *Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand*

[2] *Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs), Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand*

**Corresponding Author : pha.sontaya@yahoo.co.th*

ABSTRACT

Tagetes erecta Linn. is a native of Thailand which are employed to the treat disease such as jaundice, hepatitis, and cardiovascular. It has been reported that the flower of *T. erecta* is a source of bioactive compounds with interesting antioxidant activity. The DPPH method is currently used for determination of antioxidant activity. In this research, a fluorescence quenching method is developed for evaluation of total antioxidant capacity of *T. erecta* flower extract. The CdS quantum dots (QDs) were synthesized in a mixed solution between methanol and dimethyl formamide at room temperature. Maximum emission wavelength (λ_{em}) of QDs was found at 730 nm. Prior to apply to the crude flower extract, it was tested with an ascorbic acid. Results revealed that the fluorescence intensity of the QDs was linearly decreased with increasing the acid concentration, up to 1000 mg·L^{-1}($y = 0.153x + 0.810$; $r^2 = 0.9850$). The solution of *T. erecta* was prepared by dilution (of a stock extraction fraction) with methanol then, the QDs were applied to the solution. The results showed that the intensity was linearly decreased with increasing the extract concentration, ranging from 20 to 100 mg·L^{-1}($y = 0.015x + 0.879$; $r^2 = 0.9580$). Further study will be required for isolation of crude extract by solvent partitioning technique before testing with the QDs. In addition, investigation of an antioxidant activity of each fraction by using this method will be also studied.

Keywords *Tagetes erecta* Linn; Anti-oxidant capacity; Quantum dot; Fluorescence

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

METHOD DEVELOPMENT FOR EVALUATION OF TOTAL ANTI-OXIDANT CAPACITY OF *TAGETES ERECTA* LINN. FLOWER EXTRACT

Sontaya Phanrudee[1,*], Nathawut Choengchan[2], and Patchanee Charoenying[1]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

[2]Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs), Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

[*] Author for correspondence; E-Mail: Pha.sontaya@hotmail.com, Tel. +66 11 523690

Abstract: In this research, a fluorescence quenching method has been developed for evaluation of total antioxidant capacity of *T. erecta* flower extract. The CdS quantum dots (QDs) were synthesized in a mixed solution between methanol and dimethyl formamide at room temperature. Maximum emission wavelength (λ_{em}) of QDs was found at 730 nm. Prior to applying to the crude flower extract, it was tested with ascorbic acid. Results revealed that the fluorescence intensity of the QDs was linearly decreased with increasing acid concentration, up to 1000 mg·L^{-1}(y = 0.159x + 0.787; r^2 = 0.9970). The solution of *T. erecta* was prepared by dilution (of a stock extraction fraction) with methanol, then the QDs were applied to the solution. The results showed that the intensity was linearly decreased with increasing concentration of the extract, ranging from 20 to 100 mg·L^{-1}(y = 0.032x + 0.834; r^2 = 0.9940).

1. Introduction

Antioxidants from natural product extracts have attracted increasing interest, due to human awareness and perception of the danger of side effects and the toxicity of synthetic antioxidants in food. Extracts of fruits [1-3], vegetables [4], flowers [5-8] and their by-products, such as wheat and soybean by-products [9-10], mango peel [11], and peel, pulp and seed of fruits (guava, kiwifruit, purple mulberry, strawberry, white pomegranate, lukan and honey tangerine pulps and etc.) [12], all revealed effective antioxidant activity in a trial model. Natural antioxidants were also tested in real food systems. For example, carob fruit extracts importantly in decelerated lipid oxidation in cooked pork meat [13].

Flowers are natural products and major sources of bioactive compounds, which have been abundantly reported on describing successful therapies for conditions such as cardiovascular, cancer, jaundice and hepatitis diseases [14]. *Tagetes erecta* belongs to the family of Compositae, a prevalent garden plant and is commonly known as Marigold. It is a native of the Americas, especially in Mexico, and has been very popular in South Asia, Southwest Asia and is cultivated in Thailand and India for religious ceremonies. Recently the *T. erectra* flower extract has been reported to be revealing the presence of active compounds such as antimicrobial, antiwrinkle and antioxidant agents [15].

Several methods have been reported for the determination of antioxidant activity. The most common method has been generally based on the inhibition of radicals by the presence of antioxidants. Oxidizing reagents could be organic radical producers. Free radical reagents are reduced by antioxidants and the absorbance at certain wavelengths is decreased, such as 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) or Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), ferric reducing/antioxidant power (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) [16-17]. These methods have advantages in that they are accurate, rapid, comfortable, repeatable and inexpensive. However, these methods have some drawbacks of the stability of the color agents. Therefore, this research focuses on the development of the fluorophore agents. In recent years, the applications of water-soluble QDs in the fields of analytical chemistry have attracted a growing interest because of their advantages over organic fluorescent dyes. Currently, Quantum dots (QDs) were used in numerous works such as luminescence probe for detection of heavy and transition metal ions [18] and sensor for the detection of glucose [19]. The QDs had good optical properties and stability. The objectives of this research are to focus on the synthesis of CdS QDs using the fluorophore agents, and used for evaluation of total antioxidant capacity from flowers extract of *T. erecta*.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and apparatus

Cadmium nitrate (four hydrate) (Cd)NO_3($_2$·$4H_2O$), and sodium sulfide (nine hydrate) ($Na_2S·9H_2O$) were purchased from Lab Systems Co.; Ltd.. All other reagents and solvents analytical grade were used. The absorption spectra were acquired on a SHIMADASU UV-1800 spectrophotometer. All fluorescence measurements were made with a JASCO FP-6300 fluorescence spectrophotometer equipped with a plotter unit and a 1 cm quartz cell.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Plant sample

The flowers of *T. erecta* were collected from the Department of Plant Production Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

2.3 Preparation and characterization of CdS QDs

The CdS Quantum dots were prepared at room temperature by applying from the procedures of Saha [20] and Shozo [21]. Cadmium nitrate and sodium sulfide were used as precursors. Dimethyl formamide (DMF) and methanol were used as co-solvents. A 100 mL of 3.2 mM $Cd(NO_3)_2$ solution was mixed with 100 mL of 3.2 mM Na_2S solution. Yellow CdS colloidal solution was rapidly obtained. The mixed solutions were stirred for 3-5 mins. And then, the CdS colloidal solution was characterized for optical absorption by using a UV-Vis spectrophotometer (SHIMADASU UV-1800) with co-solvent of methanol and DMF in 1:1 ratio as reference solution. The photoluminescence studies were also carried out on the colloidal solution using a JASCO FP-6300 spectrafluorometer.

2.4 Extraction

Ground dry flowers of *T. erecta* (20 g) sample were extracted with methanol (300 mL) for 7 days at room temperature. The supernatant and the sediment were separated by filtration through cheesecloth and once through Whatman No. 1 filter paper. The residue was extracted two times as described as the first extraction. The total extraction of the solutions was evaporated under reduced pressure to give a crude methanol extract (12.85 g, 64.18% w/w).

2.5 Evaluation of anti-oxidant activity

2.5.1 DPPH assay

The antioxidant activity of the crude methanol extracts was measured in terms of hydrogen-donating or radical scavenging ability, using the DPPH method [22]. Crude methanol extract (10 mg/mL) was mixed with 2.9 mL of DPPH radical solution in ethanol (4.5%v/v). The reaction mixtures were shaken vigorously and incubated in the dark for 30 min. The absorbance of solution was measured at 517 nm. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a standard antioxidant.

2.5.2 Fluorescence quenching method

The method development, fluorescence quenching of CdS QDs by antioxidants was measured in crude methanol extract while ascorbic acid was used as standard test. One milliliter of QDs colloids solution was aliquoted into a test tube, then 9 mL of crude methanol extract (of a stock concentration up to 1000 $mg \cdot L^{-1}$) was added into the test tube and shaken vigorously. The mixed solutions were then measured by fluorometer. Under the excitation wavelength of 370 nm, the fluorescence spectra of QDs were recorded at wavelength of 730 nm.

3. Results and Discussion

3.1. Optical property of CdS QDs

The synthesis of CdS QDs has been achieved by several groups [22]. Here in this work, the mixed solvents between methanol and DMF were easily synthesized without stabilizing agent. The UV/vis absorption and PL emission spectra of synthesized CdS QDs are shown in Fig. 1. The obtained QDs exhibited a broad absorption spectra and symmetrical emission peaks with the excitation wavelength at 370 nm.

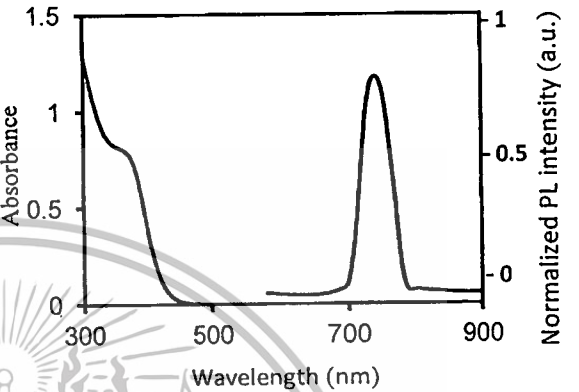


Figure 1. UV/vis absorption and PL emission spectra of synthesized CdS QDs.

3.2 Total antioxidant capacity (TAC)

3.2.1 Determination of TAC by DPPH method

The DPPH assay is a preliminary test to investigate the antioxidant potential of extract. The results found that the crude methanol extract of *T. erecta* flower showed an antioxidant potential with EC_{50} value with 9.5 µg/ml. This result was in good agreement with the study of Pratheesh *et al.* (2009) and their report of xanthophylls antioxidant activity of the crude extract of *T. erecta*. The results of this study provided evidence that *T. erecta* has antioxidant potential.

3.2.2 Determination of TAC by CdS QDs method

The proposed method was applied to the determination of antioxidant activity in crude methanol extract of *T. erecta* flower. L-ascorbic acid was used as a standard test before being applied to real sample. The ratio of the initial CL intensity I_0 of CdS QDs system to the CL intensity I at a given concentration of L-ascorbic acid, I_0/I, was proportional to the concentration of L-ascorbic acid. The L-ascorbic acid concentration dependence of the CL intensity was coincident with the fluorescence quenching described by a Stern–Volmer equation Eq. 1.

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] \qquad \text{(Eq. 1)}$$

K_{sv} was found to be 1.59×10^{-1} $mol^{-1} \cdot L$. This large value provided a sensitive CL detection of L-ascorbic acid (Fig. 2a and 2b). Under the optimized experimental conditions, the relative CL intensity decreased linearly in the concentration range of 200–1000 $mg \cdot L^{-1}$ for L-ascorbic acid ($R^2 = 0.9970$).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

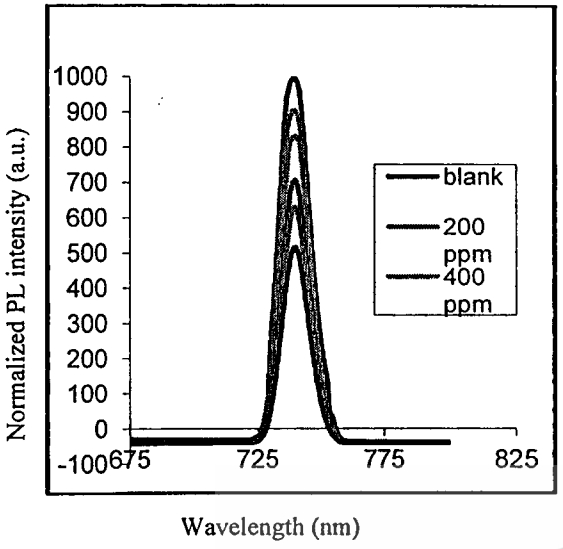


Figure 2a. PL spectra representing the quenching effect of L-ascorbic acid with different concentrations on CdS QDs PL intensity.

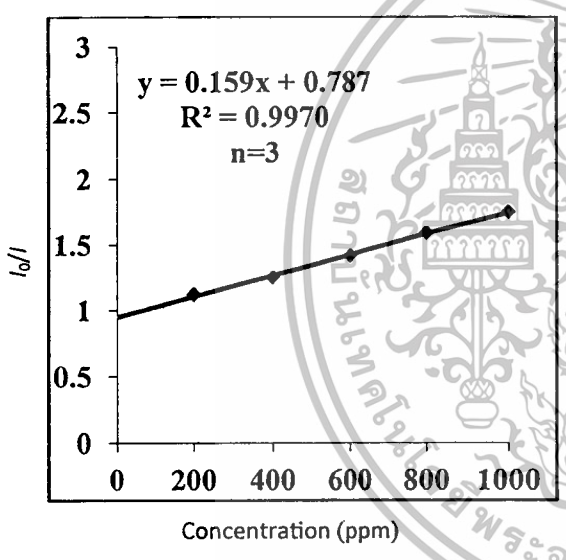


Figure 2b. The relationship between I_0/I and the concentration of L-ascorbic acid detection using CdS QDs.

In order to achieve the sensitive detection of L-ascorbic acid, the quenching of CdS QDs by L-ascorbic acid was investigated. Results showed that the QDs PL intensity decreased with the increase of acid concentration, and it was found that linear relationship existed between the PL intensity decreased with increasing acid concentration. After that The CdS QDs colloids solution was applied to *T. erectra* flower extract. As shown in Fig. 3a and 3b, the result displayed the effect of the concentration of crude methanol extract solution on CdS QDs. There was a linear relationship between the fluorescence intensity of CdS QDs and extract solution concentration. As a result, a spectrofluorometric method for methanolic solution would be developed based on the quenching effect of methanolic solution on the fluorescence of CdS QDs. The strategy was actualized through the optimization of the experimental conditions. Stern–Volmer equation K_{sv} was found to be 3.20×10^{-2} $mol^{-1}\cdot L$. This large value provided a sensitive CL detection of crude methanol extract (Fig. 3a and 3b). Under the optimized experimental conditions, the relative CL intensity decreased linearly in the concentration range of 20–100 mg· L^{-1} for crude methanol extract ($R^2 = 0.9940$).

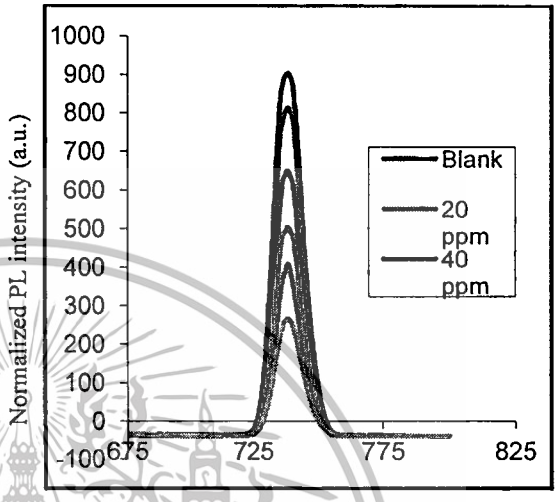


Figure 3a. PL spectra representing the quenching effect of crude methanol extract of *T. erectra* with different concentrations on CdS QDs PL intensity.

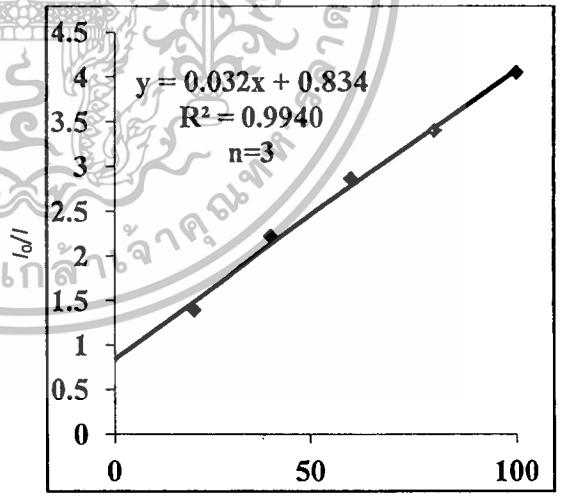


Figure 3b. The relationship between I_0/I and the concentration of crude methanol extract of *T. erectra* detection using CdS QDs.

The results indicated that the proposed CL system has good linearity, relatively high sensitivity and precision and acceptable reproducibility.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

4. Conclusions

A fluorescence quenching method has been developed as a novel and convenient technique for antioxidant determination based on the quenching of the fluorescence of CdS QDs. The possible quenching mechanism is due to the change of the surface of the CdS QDs. Under optimum conditions, the method achieved a good linear relationship between relative fluorescence intensity ratio of the system and concentration of L-ascorbic acid in the range of 200 to 1000 $mg \cdot L^{-1}$. It is prospective to apply this technique to determine the antioxidant activity in biological samples. The method provides a fairly practical and economical approach.

Further study will be required for isolation of crude extract by solvent partitioning technique before testing with the QDs. In addition, investigation of an antioxidant activity of each fraction by using this method will be also studied.

Acknowledgements

Authors acknowledge the Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for financial support and we also thank Associate Professor Dr. Chamroon Laosinwattana for kindly providing the plant materials.

References

[1] M. A. Hossain and S.M. M. Rahman. *Journal of Food Research International*. 44 (2011) 672–676.

[2] S.h. Zhou, Z.x. Fang, Y. Lü, J.c. Chen, D.h. Liu, and X.q. Ye, *Food Chem.* 112 (2009) 394–399.

[3] J. Scalzoa, A. Politib, N. Pellegrini, B. Mezzetti, and M. Battino, *Nutrition*. 21 (2005) 207–213.

[4] Y.H. Pyoa, T.C. Leeb, L. Logendrac, and R. T. Rosenb, *Food Chem.* 85 (2004) 19–26.

[5] L. Zhang, Q. Fu, and Y. Zhang, *Food Chem.* 127 (2011) 1444–1449.

[6] P. Siddhurajua, P.S. Mohanb, and K. Beckera, *Food Chem.* 79 (2002) 61–67.

[7] A. Kumaran and R. J. Karunakaran, Master's Thesis, Fitoterapia. 78 (2007) 46–47.

[8] A. A. Elzaawely, Tr. D. Xuan, H. Koyama, and S. Tawata, *Food Chem.* 104 (2007) 1648–1653.

[9] T. S. Tyug, K. N. Prasad, and A. Ismail, *Food Chem.* 123 (2010) 583–589.

[10] F. Esposito, G. Arlotti, A. M. Bonifati, A. N. Davide Vitale, and V. Fogliano, *Food Research International.* 38 (2005) 1167–1173.

[11] H. Kim, J. Y. Moon, H. Kim, D.S. Lee, M. Cho, H.K. Choi, Y. S. Kim, A. Mosaddik, and S. K. Cho, *Food Chem.* 121 (2010) 429–436.

[12] C. Guo, J. Yang, J. Wei, Y. Li, J. Xu, and Y. Jiang, *Nutr. Res.* 23 (2003) 1719–1726.

[13] S. Bastida, F. J. Snchez-Muniz, R. Olivero, L. Olleros, B. R.Roso, and F. J.Colmenero, *Food Chem.* 116 (2009) 748–754.

[14] Mauro Serafini, *Nutrition and coexisting disease*. 34 (2006) 533–535.

[15] N. Maitya, N. K. Nemaa, M. K. Abedya, B. K. Sarkarb, and P. K. Mukherjee, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 1300– 1305.

[16] J. Deng, W. Cheng, and G. Yang, *Food Chem.* 125 (2011) 1430–1435.

[17] J. P.Jiménez, S. Arranz, M. Tabernero, M. E. Díaz-Rubio, J. Serrano, I. Gon˜i, and F. Saura-Calixto, *Food Research International*. 41 (2008) 274–285.

[18] J. Chena, A. Zheng, Y. Gao, C. Hea, G. Wu, Y. Chena, X. Kai, and C. Zhu, *Spectrochim. Acta Part A*. 69 (2008) 1044–1052.

[19] J. Yuana,W. Guo, J. Yinb, and E. Wang, *Talanta* 77 (2009) 1858–1863.

[20] A. Datta, A. Saha, A.K. Sinha, S.N. Bhattacharyya, and S. Chatterjee. *J. Photochem. Photobio.' B: Biolog.* 78 (1999) 69-75.

[21] K. Murakoshi, H. Hosokawa, M. Saitoh, Y. Wada, T. Sakata, H. Mori, M. Satoh, and S. Yanagida, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94 (1998) 579-586.

[22] Liu, H., Qiu, N., Ding, H. and Yao, R., *Food Research International* 41 (2008) 363–370.

[23] Philippe Guyot-Sionnest, *C. R. Physique*. 9 (2008) 777–787.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

THE ESSENTIAL OIL FROM *Tagetes erecta* LINN. FLOWER AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLOWER EXTRACTS

Rattawan Poonrom,[1] Chamroon Laosinwattana,[2] Patchanee Charoenying,[1,*]
[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[2]Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
*e-mail: kcpatcha@kmitl.ac.th

Abstract: In this work chemical composition of the flower oil of *Tagetes erecta* Linn. and antioxidant activity of flower extracts were investigated. Hydro-distilled volatile oils from the flowers were analyzed by GC/MS. Twenty-seven components in flower oil were identified. The main essential oil characterized constituents were linalool (4.4%), α-terpineol (1.9%), caryophyllene (17.4%), germacrene-D (1.1%), spathulenol (1.2%), caryophyllene oxide (2.6%) and 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (2.4%). Furthermore, the crude methanol extract was partitioned with different solvent system by increasing their polarities (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol). These extracts were evaluated for antioxidant activity using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method while Folin-Ciocalteu method was used for the total phenolic content. *n*-Butanol extract showed the highest total phenolic content of 14.686 mg GAE/g dw and consequently had strong antioxidant activity with EC_{50} of 4.55 μg/mL.

References:

1. Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham: Food Chem 2005; 92:491-497.
2. Kiranmai M, Mohammed I: Anibacteri: Int J Pharm 2012; 2: 90-96.
3. Rosa M, Heliodoro H & Sergio H: J. Chil. Chem. Soc 2006; 51:883–886.
4. Sefidkon F, Salehyar S, Mirza M, Dabiri M: Flavour Fragr. J 2004; 19:579-581.
5. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM: Food Chem 2003; 83:547-550.

Acknowledgements: The authors acknowledge the Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for financial support.

Keywords: *Tagetes erecta* L., volatile oil, antioxidant activity, DPPH, total phenolic content

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

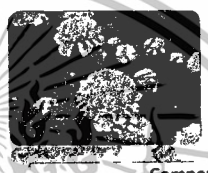
THE ESSENTIAL OIL FROM *Tagetes erecta* Linn. FLOWER AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLOWER EXTRACTS

Rattawan Poonrom[1], Chamroon Laosinwattana[2], Patchanee Charoenying[1]

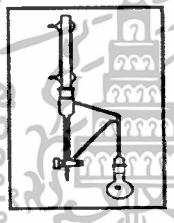
[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.
[2]Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.
Email : laluna_Z@hotmail.com

Abstract: In this work, chemical composition of the flower oil of *Tagetes erecta* Linn. and antioxidant activity of flower extracts were investigated. Hydro-distilled volatile oils from the flowers were analyzed by GC/MS. Twenty seven components in flower oil were identified. The main essential oil characterized constituents were linalool (4.3%), α-terpineol (1.9%), caryophyllene (17.4%), germacrene-D (1.1%), spathulenol (1.2%), caryophyllene oxide (2.6%) and 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (2.4%). Further, the flower oil was analyzed by gas chromatography-mass spectrometer. The crude methanol extract was partitioned with different solvent systems by increasing their polarities (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol). These extracts were evaluated for antioxidant activity using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method while Folin-Ciocalteu method was used for the total phenolic content. *n*-Butanol extract showed the highest total phenolic content of 14.686 mg GAE/g dw of extract and consequently had strong antioxidant activity with EC_{50} of 4.55 µg/mL.

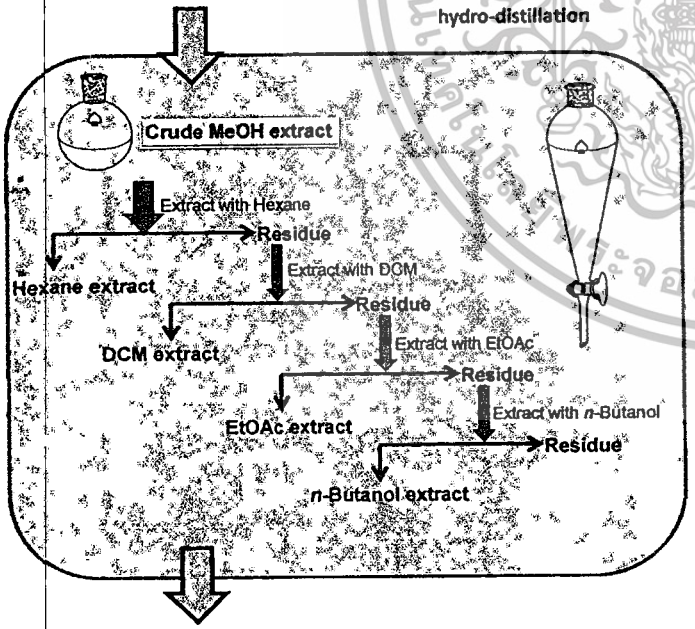
Plant material: The fresh flowers of *T. erecta* were collected from the experimental field at the King Mongut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand.



Dried flowers

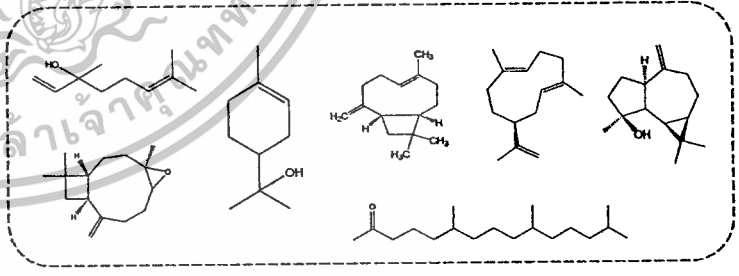


hydro-distillation



GC-MS analysis

Compound	Retention time	(%)
Linalool	7.929	4.4
α-Terpineol	9.353	1.9
Geraniol	9.844	0.4
Piperitone	10.292	0.5
Caryophyllene	12.629	17.4
Germacrene-D	13.389	1.1
Germacrene-B	13.578	0.4
Spathulenol	14.581	1.2
Caryophyllene oxide	14.668	2.6
α -Cardinol	15.450	0.3
Caryophyllenol	15.488	0.3
6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	17.587	2.4



Extract	Total phenolic content[a] (mg GAE/g dw)	Antioxidant activity[b] (DPPH radical scavenging) (EC50 µg/ml)
Methanol	39.886	9.5
Hexane	0.820	-
Dichloromethane	4.632	17.6
Ethyl acetate	7.401	12.5
n-Butanol	14.686	4.55

a The experiments were measured according to the Folin-Ciocalteu method;
b The experiment was performed using DPPH free radical scavenging assay.
Antioxidant activity of standard used for DPPH assay was BHT: butylatedhydroxytoluene (8.00 µg/ml)

Conclusion: Methanol extract of *T. erecta* flower showed an antioxidant potential with EC_{50} value with 9.5 µg/ml and the extracts from solvent partitioning *n*-butanol extract exhibited the highest antioxidant activity (4.55 µg/ml). The flower oil was analyzed by a gas chromatography-mass spectrometer and the main essential oil characterized constituents were linalool (4.4%), α-terpineol (1.9%), caryophyllene (17.4%), germacrene-D (1.1%), spathulenol (1.2%), caryophyllene oxide (2.6%) and 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (2.4%).

References:
Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham: Food Chem 2005;92:491-497.
Kiranmai M, Mohammed I: Anibacteri: Int J Pharm 2012; 2: 90-96.
Rosa M, Heliodoro H & Sergio H: J. Chil. Chem. Soc 2006; 51:883–886.

Acknowledgements: Department of Faculty of science of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for financial support.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

VTC

IVE
国立大学法人
長岡技術科学大学
Nagaoka University of Technology

KOSEN
国立高等専門学校機構

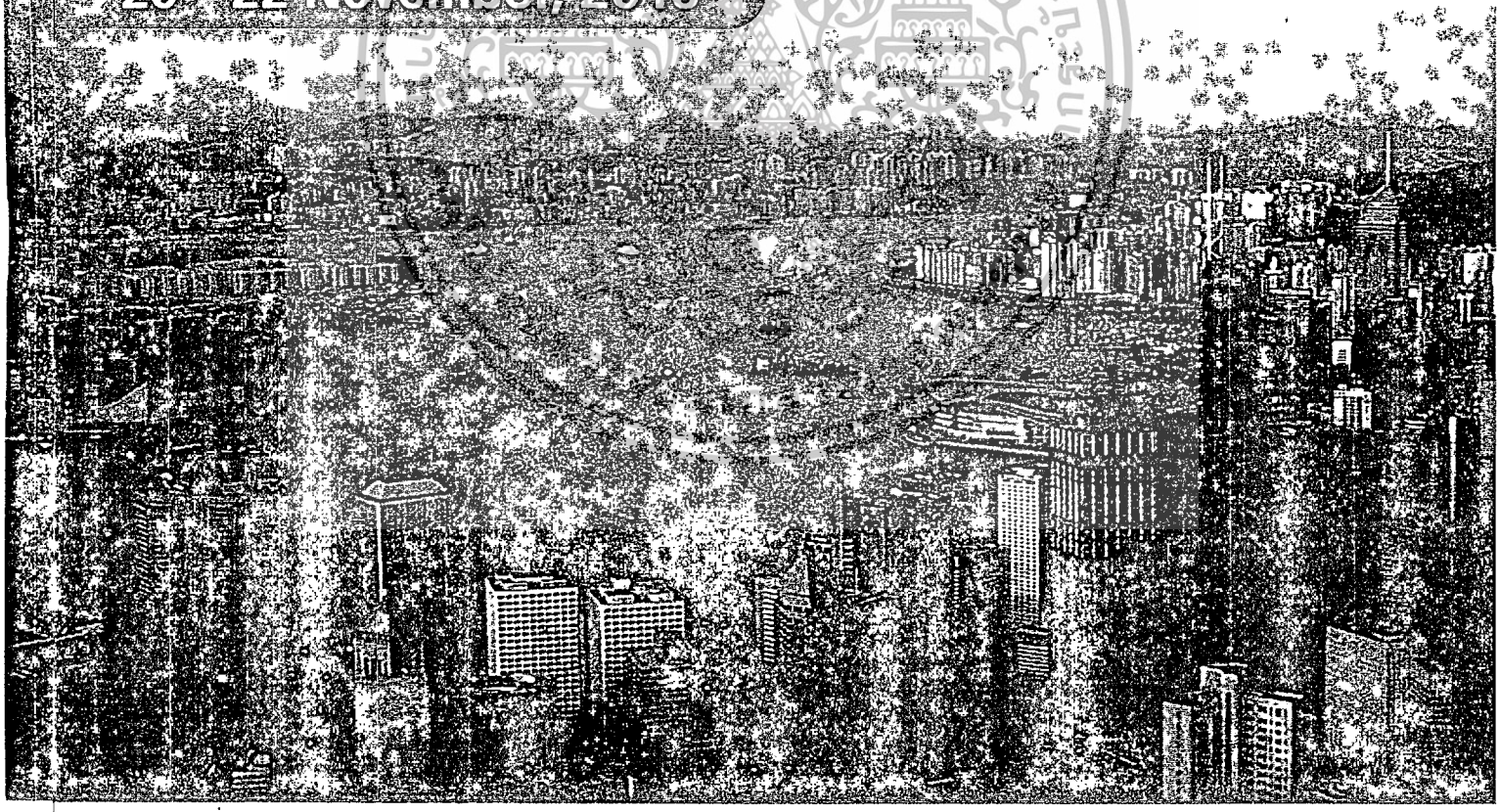
国立大学法人
豊橋技術科学大学
TOYOHASHI
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

ISTS

3rd International Symposium on Technology for Sustainability 2013

Hong Kong Institute of Vocational Education (Tsing Yi)

20 – 22 November, 2013



Organized by:
Engineering Discipline, Hong Kong Institute of Vocational Education
Vocational Training Council, Hong Kong
Institute of National Colleges of Technology, Japan
Nagaoka University of Technology, Japan
Toyohashi University of Technology, Japan

ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือเผยแพร่ส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารนี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Tagetes erecta* Linn. Flower in Thailand

Rattawan POONROM, Porn-a-nan ARSA,
Supisa SANGKATIN, Khwanravin TRAIPRAWAT,
Patchanee CHAROENYING
Department of Chemistry, Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Bangkok, Thailand
laluna_z@hotmail.com
nickpornanan@gmail.com
kik_deddan@hotmail.com
yakuza_taloktoktak@hotmail.com
kcpatcha@kmitl.ac.th

Chamroon LAOSINWATTANA
Department of Plant Production Technology,
Faculty of Agricultural Technology
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Bangkok, Thailand
laosinwattana@hotmail.com

***Abstract*— This study investigates antioxidant activity and total phenolic content from the flowers of *Tagetes erecta* L. extracts. The dried flowers of *T. erecta* were extracted by methanol. The crude methanolic extract was partitioned with different solvent system by increasing their polarities (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol). Antioxidant activity of the extracts of *T. erecta* was evaluated using a 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging method. Total phenolics content were calculated using Folin-Ciocalteu's reagent. The flower extract partitioned with ethyl acetate exhibited highest amount of total phenols (122.3 mg GAE/g dry weight), among all other extracts, and with EC_{50} value of 8.1 µg/mL. These results suggest that the flower of *T. erecta* is a source of bioactive compounds with interesting antioxidant activity. Future research should pursue further isolation and identification of antioxidant chemicals.**

Keywords*— *Tagetes erecta* L., *antioxidant activity, DPPH, total phenolic content

I. Introduction

The biologically active compounds research, antioxidant compounds, from plant has always been of great interest for scientists, looking for new sources of useful food, cosmetic and pharmaceutical products. There has been a considerable interest in finding natural antioxidants from plant materials to replace synthetic ones. Natural antioxidants occur in all higher plants, and in all parts of the plant; wood, bark, stems, pods, leaves, fruit, roots, flowers, pollen and seeds. Typical compounds that show antioxidant activity include carotenoids, essential oils and polyphenol compounds [1]. *Tagetes erecta* Linn. belongs to the family of Asteraceae widely used in olden days for the treatment of wounds. It is very popular as a garden plant and yields a strongly aromatic essential oil, which is mainly used for the compounding of high-grade perfumes. Different parts of this plant including flower are used in folk medicine to cure various disease [2]. Nowadays, *T. erecta* is grown to extract lutein, a common yellow or orange food colour [3]. The objective of the present research was to investigate chemical composition of the flower oil and also the antioxidant activity of the extracts of *T. erecta* cultivated in Thailand.

II. Experimental

A. Plant material

The fresh flowers of *T. erecta* were collected from the experimental field at the King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand.

B. Extracting of plant material

The mature and healthy flowers were cleaned with running tap water, dried-up in a hot air oven at 45 °C for 3 days and ground to powder in an electric blender. Five hundred gram of dried powder sample was macerated in methanol (4 l) at room temperature for 7 days with occasional stirring and shaking. The extract was then filtered first through a fresh cotton plug and finally with a Whatman No. 1 filters paper. The filtrate was concentrated to dryness under reduce pressure using a rotary evaporator at 50 °C. The concentrated methanol extract was the left air dried in a fume cupboard. The methanol paste crude extract (50 g) was suspended in water and was then further partitioned with *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol using separatory funnel. Extracts collected were evaporated to dryness using a rotary evaporator before left air dried in a fume cupboard. Dried paste extracts were kept in refrigerator at 4 °C for further analysis.

C. Determination of total phenolic compounds

The phenolic content was expressed as milligrammes of Total phenolic content was determined with the Folin-Ciocalteu reagent [4]. To 50 µl of sample (three replicates), 2 ml 1/10 dilution of Folin-Ciocalteu reagent and 2 ml of Na_2CO_3 (7.5%, w/v) were added and incubated at 45 °C for 15 min. The absorbance of the sample was measured at 765 nm using a Thermo Spectronic-Genesys 10 series spectrophotometer. gallic acid equivalent per gramme of dry weight (mg GAE/g dw).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

D. Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity of the extracts was measured in terms of hydrogen-donating or radical scavenging ability, using the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Each of sample extracts (10 mg/ml) was mixed with 2.9 ml of DPPH radical solution in ethanol (4.5% v/v). The reaction mixtures were shaken vigorously and incubated in the dark for 30 min. The absorbance of solution was measured at 517 nm. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a standard antioxidant.

III. Results and Discussion

A. Extraction yields

The crude methanol extract was partially purified by solvent-solvent partition. The percentage yields from fractions are in the order of ethyl acetate extract (27.62%) > *n*-hexane extract (18.96%) > *n*-butanol extract (18.10%) > dichloromethane extract (1.46%) base on the crude methanol extract.

B. Determination of total phenolic content

As shown in Table 1, total phenols expressed as mg gallic acid equivalent/g of dry weight ranged from 7.1 mg GAE/g dw to 122.3 mg GAE/g dw. According to the obtained results, it was evident that the extract from solvent partitioning, ethyl acetate extract showed the highest phenolic content value with 122.3 mg GAE/g dw. *n*-Hexane was the least effective solvent for phenolic extraction. It was noticed that the hexane extract with no phenolic compounds obtained as the non-polar solvent used was expected to collect fat soluble compounds for instance lipids or chlorophylls.

C. Antioxidant activity

The antioxidant activity of the different extracts of *T. erecta* was investigated and expressed in terms of EC_{50} which denotes the required sample concentration to inhibit 50% of DPPH in the reaction mixture. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as standard. The results found that the highest ability of DPPH radical inhibition was exhibited by the ethyl acetate extract, with EC_{50} value of 8.1 μg/mL, followed by *n*-butanol extract, dichloromethane extract, and methanol extract with respective EC_{50} values of 28.5 μg/mL, 30.0 μg/mL and 36.0 μg/mL (Table 1). The different results suggest that the extractability of different solvents provided a variety of antioxidant capacity based upon the oxidant property content.

TABLE I. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF VARIOUS *T. ERECTA* EXTRACTS

Extract	Total phenolic content[a] (mg GAE/g dw)	Antioxidant activity[b] (EC_{50} μg/mL)
Methanol	38.3 ± 1.66	36.0 ± 1.78
n-Hexane	7.1± 0.78	-
Dichloromethane	41.1 ± 1.63	30.0 ± 0.77
Ethyl acetate	122.3 ± 0.00	8.1 ± 1.01
n-Butanol	50.5 ± 2.26	28.5 ± 0.31

a The experiments were measured according to the Folin-Ciocalteu method;
b The experiment was performed using DPPH free radical scavenging assay. Antioxidant activity of standard used for DPPH assay was BHT: Butylated hydroxytoluene (7.5 ± 1.49μg/ml)

IV. Conclusions

With these results, it was revealed that the different extracts of *T. erecta* exhibited different levels of total phenolic contents and antioxidant activity. The ethyl acetate extract had the highest phenolic content as well as the highest antioxidant potency compared to the other extracts. The finding of the antioxidant property suggested that *T. erecta* collected from Thailand has potential to be used to provide natural antioxidants.

Acknowledgment

The authors acknowledge the Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for financial support.

References

[1] A. Chanwitheesuk, A.Teerawutgulrag, and N. Rakariyatham, "Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand," Food Chemistry, vol. 92, pp. 491–497, 2005.

[2] M. Kiranmai, and M. Ibrahim, "Antibacterial potential of different extracts of *Tagetes erecta* Linn." International Journal of Pharmacy, pp. 90-96, 2012.

[3] R.M.P. Gutiérrez, H.H. Luna, and S.H. Garrido, "Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil." J. Chilean chemical society, vol. 51, pp. 883-886, 2006.

[4] J. Javanmardi, C. Stushnoff, E. Locke, and J.M. Vivanco, "Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions." Food Chemistry, vol. 83, pp. 547-550, 2003.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

[1] Pratheesh, V.B., N. Benny and C. H. Sujatha. 2009. Isolation, Stabilization and Characterization of Xanthophyll from Marigold Flower-*Tagetes erecta- L.* **Modern Applied Science.**, 3:9-28.

[2] **รัฐตะวัน พูลรมย์ สาวิกา หมานมา และสุภาวิณี สุขโสม. 2553. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของดาวเรือง. โครงงานพิเศษ สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.**

[3] J. Javanmardi, C. Stushnoff, E. Locke and J.M. Vivanco. 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian *Ocinum accessions*., **Food Chemistry.** 83, pp. 25-30.

[4] **จันทิกา ชูโชติรส จินตนา กูบกระโทก และชมพูนุช อย่างละมัย. 2545. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกชุมเห็ดเทศ. โครงงานพิเศษภาควิชาเคมี สาขาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.**

[5] Graham, G. 1992. Green tea Composition, Consumption and Polyphenol Chemistry. **Preventive. Medicine.** 21, 334-350.

[6] Sithisarn, P., R. Supabphol and W. Gritsanapan,. 2005. Antioxidant Activity of Siamese neem tree., **Journal of Ethnopharmacology**, 99, pp. 109-112.

[7] Deachathai, S., W. Mahabusarakum, S. Phongpaichit, W. C. Taylor, Y. -J. Zhang and C.-R. Yang. 2006. Phenolic Compounds from the Flowers of *Garcinai dulcis*., **Phytochemistry**, 67, pp. 464-469.

[8] **กชกร สุขจันทร์. สารเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ: สมุนไพร.** http://www.ttmed.psu.ac.th/read.php?0

[9] **รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. 2547. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.**

[10] **เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์.**

[11] **โอภา วัชระคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: พี. เอส. พริ้นท์.**

[12] **นิจศิริ เรืองรังสี. 2534. พืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.**

[13] **อาหารต้านโรค.** http://www.calintertrade.co.th/blog/

[14] **นฤตยา นันยา. การศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทย. กรุงเทพฯ : หลักสูตรพืชสวน สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.**

[15] **บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. 2549. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.**

[16] **ลักษณะพฤกษศาสตร์ของดาวเรือง.** http://www.nanagarden.com/ลักษณะพฤกษศาสตร์ของดาวเรือง-10143-13.html

[17] **สารสกัดจากดอกดาวเรือง.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.vistra.co.th/vistra/know_detail.php?know_id=43

[18] S. Cetkovic, M. Djilas, M. Canadanovic-Brunet and T. Tumbas. 2004. Antioxidant Properties of Marigold Extracts. **Food Research International**, 37, pp. 643-650.

[19] Y. Gong, X. Liu, W. He, H. Xu, F. Yuan and Y. Gao. 2012. Investigation Into the Antioxidant Activity and Chemical Composition of Alcoholic Extracts from Defatted Marigold (*Tagetes erecta* L.) Residue. **Fitoterapia**, 83, pp. 481-489.

[20] O. Kaisoon, S. Siriamornpun, N. Weerapreeyakul and N. Meeso. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Edible Flowers from Thailand. **Journal of Functional Foods**, 3, pp. 88-99.

[21] S. Siriamornpun, O. Kaisoon and N. Meeso. 2012. Changes in Colour, Antioxidant Activities and Carotenoids (Lycopene, β-Carotene, Lutein) of Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.) Resulting from Different Drying Processes. **Journal of Functional Foods**, 4, pp. 757-766.

[22] M. A. Hossain, M. D. Shah, C. Gnanaraj and M. Iqbal. 2011. *In vitro* Total Phenolics, Flavonoids Contents and Antioxidant Activity of Essential Oil, Various Organic Extracts from the Leaves of Tropical Medicinal Plant *Tetrastigma* from Sabah. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, pp. 717-721.

[23] K. Yamasaki, A. Hashimoto, Y. Kokusenya, T. Miyamoto and T. Sato. 1994. Electrochemical Method for Estimating the Antioxidative Effects of Methanol Extracts of Crude Drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 42, pp. 1663–1665.

[24] Y.S. Shyu, J.T. Lin, Y.T. Chang, C.I. Chiang and D.J. Yang. 2009. Evaluation of Antioxidant Ability of Ethanolic extract from Dill (*Anethum graveolens* L.) flower., **Food Chemistry**, 115, pp. 515-521.

[25] (a) K.N. Prasad, E. Yang, C. Yi, M. Zhao and Y. Jiang. 2009. Effects of High Pressure Extraction on the Extraction Yield, Total Phenolic Content and Antioxidation Activity of Longan Fruit Pericarp., **Innovative Food Science Emerging Technologies**, 10, pp. 155-159.

(b) M. Schwarz, S. Hillebrand, S. Habben, A. Degenhardt and P. Winterhalter. 2003. Application of High-speed Countercurrent Chromatography to the Large-Scale Isolation of Anthocyanins., **Biochemical Engineering Journal**, 14, pp. 179-189.

[26] Z. Lui, S. Li, N. Han, D. Sun, Y. Cao and J. Yin. 2008. Studied on the Chemical Constituents of the Vines of *Streptocanlon juventas* (Lour.) Merr., **Asian Journal of Traditional Medicines**, 3(5), pp. 193-198.

[27] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga. 1996. Structure antioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, 20, pp. 933-956.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[28] M. Valyova, S. Stoyanov, Y. Markovska and Y. Ganeva. 2012. Evaluation of *in vitro* Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Potential of Variety of *Tagetes erecta* L. Flower Growing in Bulgaria. **International of Applied Research in Natural Products,** 5 (2), pp. 19-25.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้