การแยกและการหาโครงสร้างสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง

ISOLATION AND CHARACTERIZATION ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM Tagetes erecta L. FLOWERS

พรพรรณี์ ตาเพา

นางสาวภูมิตา ดังพิทัน

นางสาวพัชรินท์ ไตรประวัติ

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2555

การแยกและการหาโครงสร้างสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง

ISOLATION AND CHARACTERIZATION ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM *Tagetes erecta* L. FLOWERS

นายพรอนันต์ อาษา

นางสาวศุภิศา สังขทิน

นางสาวขวัญรวินท์ ไตรประวัติ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเคมีอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND CHARACTERIZATION ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM *Tagetes erecta* L. FLOWERS

MISTER PORN-A-NAN ARSA

MISS SUPISA SANGKATIN

MISS KHWANRAVIN TRAIPRAWAT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การแยกและการหาโครงสร้างสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง

ISOLATION AND CHARACTERIZATION ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM *Tagetes erecta* L. FLOWERS

ชื่อนักศึกษา นายพรอนันต์ อาษา

นางสาวศุภิศา สังขทิน

นางสาวขวัญรวินท์ ไตรประวัติ

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พัชนี เจริญยิ่ง

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2555

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.ตะวัน สุขน้อย	
ดร.อำนาจ เพิ่มทรัพย์สกุล	
ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การแยกและการหาโครงสร้างสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง	
ชื่อนักศึกษา	นายพรอนันต์	อาษา
	นางสาวศุภิศา	สังขทิน
	นางสาวขวัญรวินท์	ไตรประวัติ
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม	
ปีการศึกษา	2555	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. พัชนี	เจริญยิ่ง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกดาวเรือง โดยสกัดดอกดาวเรืองแห้งด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดแบบแบ่งส่วนด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล นำสารสกัดทั้งหมดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ DPPH assay ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดมีค่าเท่ากับ 122.388 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยรายงานเป็นค่า EC_{50} เท่ากับ 8.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตถูกนำมาแยกเป็นสารส่วนย่อยได้ 7 ส่วนย่อย (F_1-F_7) ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี สารส่วนย่อยทั้งหมดถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารส่วนย่อยที่ 5 (F_5) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด (3.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาได้แก่ สารส่วนย่อยที่ 6 (F_6) และสารส่วนย่อยที่ 4 (F_4) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 5.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนั้นสารส่วนย่อยที่ 4 (F_4) ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยข้อมูลจากเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ค่า EC_{50} ของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อยที่ 4 (F_4) มีค่าเท่ากับ 7.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดเอทิลแอซิเตตของดอกดาวเรืองมีศักยภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุดและเป็นแหล่งที่ประกอบด้วยสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation and Characterization Antioxidant Compounds from *Tagetes erecta* L. Flowers	
Students	Mister Porn-a-nan	Arsa
	Miss Supisa	Sangkatin
	Miss Khwanravin	Traiprawat
Degree	Bachelor of Science	
Major	Industrial Chemistry	
Academic	2012	
Special project advisor	Asst. Prof. Dr. Patchanee	Charoenying

Abstract

The objective of this study was to investigate antioxidant activity of *Tagetes erecta* L. flowers extract. The dried flowers of *T. erecta* was extracted with methanol. The methanol extract was further partitioned with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The antioxidant activity and total phenolic content were evaluated according to DPPH assay and Folin-Ciocalteu method, respectively. The results showed 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. All subfractions obtained were submitted to a DPPH assay. The results found that the subfraction 5 (F_5) exhibited the highest antioxidation activity (3.0 µg/ml) followed by subfraction 6 (F_6) and subfraction 4 (F_4) which EC_{50} values were 5.4 µg/mL and 5.8 µg/mL, respectively. Furthermore, the subfraction 4 (F_4) was purified by chromatographic techniques. The structure of the pure compound was elucidated on the basis of its NMR data. The EC_{50} for the isolated compound was 7.6 µg/mL. This study suggested that the ethyl acetate extract of flower of *T. erecta* has strong antioxidant potential and is a valuable source of natural antioxidants.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษเรื่องการแยกและการหาโครงสร้างสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการวิจัย รวมถึงการแก้ไขปัญหาต่างๆ และช่วยปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นระหว่างทำการวิจัยตลอดจนโครงงานพิเศษนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการ รศ.ดร.ตะวัน สุขน้อย และ ดร.อำนาจ เพิ่มทรัพย์สกุล ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา และเจ้าหน้าที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นันทนา อรุณฤกษ์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ นายรัฐตะวัน พูลรมย์ ที่คอยให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของคณะผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและคอยให้การสนับสนุน

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษนี้คงเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับงานวิจัยทางด้านนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นายพรอนันต์ อาษา
นางสาวศุภิศา สังขทิน
นางสาวขวัญรวินท์ ไตรประวัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 สารสำคัญในพืชสมุนไพร	4
2.1.1 คาร์โบไฮเดรต	5
2.1.2 ไขมัน	6
2.1.3 น้ำมันหอมระเหย	6
2.1.4 เรซินและบาลซัม	9
2.1.5 แอลคาลอยด์	9
2.1.6 ไกลโคไซด์	12
2.1.7 แทนนิน	13
2.2 การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร	14
2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช	14
2.2.2 การเลือกใช้ตัวทำละลาย	15
2.2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืช	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น 17
2.2.5 การแยกส่วนผสม 18
2.3 การเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย 20
2.3.1 ปัจจัยภายในร่างกาย 20
2.3.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย 22
2.4 สารต้านออกซิเดชัน 23
2.4.1 การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 28
2.5 ดาวเรือง 29
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 31
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 36
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 36
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 36
3.3 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง 37
3.4 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง 37
3.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน 38
3.6 การเตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล 38
3.7 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 38
3.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกดาวเรือง 39
3.9 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี 40
3.10 การเตรียมคอลัมน์และการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี 41
3.11 การแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี 41
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 44
4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง 44
4.2 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบ
ดอกดาวเรือง 44
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบ
ดอกดาวเรืองด้วยวิธี DPPH 45
4.4 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7 ด้วยวิธี DPPH 48
4.6 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 49
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี DPPH 50
4.8 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 51
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 55
5.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากดอกดาวเรือง 55
5.2 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง 55
5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบดอกดาวเรืองด้วยวิธี DPPH 55
5.4 การแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบชั้นเอทิลแอซิเตต 56
5.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดส่วนย่อย F_1-F_7 ด้วยวิธี DPPH 56
5.6 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 56
5.7 การทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 ด้วยวิธี DPPH 57
5.8 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 57
เอกสารอ้างอิง 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักสารสกัดและผลได้เป็นร้อยละ 44

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง 45

ตารางที่ 4.3 ค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง 47

ตารางที่ 4.4 การแยกสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต 48

ตารางที่ 4.5 ค่า EC_{50} ของสารส่วนย่อย F_1-F_7 49

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งของโปรตอนใน ^1H NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 52

ตารางที่ 4.7 ตำแหน่งของคาร์บอนใน ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 กระบวนการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว 21

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ DPPH ก่อนและหลังเกิดปฏิกิริยากับ Antioxidant (AH) 29

รูปที่ 2.3 ดอกดาวเรือง 29

รูปที่ 2.4 *C. arvensis* L. (GWM) และ *C. officinalis* L. (CM) 32

แผนภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี Solvent Partitioning Extraction 43

รูปที่ 4.1 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันในสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง 46

รูปที่ 4.2 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันในสารส่วนย่อย F_1-F_7 48

รูปที่ 4.3 TLC ของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 50

รูปที่ 4.4 TLC ของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_5 50

รูปที่ 4.5 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 51

รูปที่ 4.6 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 52

รูปที่ 4.7 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 53

รูปที่ 4.8 แสดงโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการค้นพบสารสำคัญหรือในความหมายคือสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่างๆ หลายชนิดจากสารสกัดทางธรรมชาติ โดยเป็นความพยายามที่เริ่มจากการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร ซึ่งเป็นสารสกัดที่สกัดมาโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้าง นับว่าสารสกัดทางธรรมชาติมีประโยชน์มาก และในเวลาต่อมาได้มีการทำสารสกัดให้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีทางกายภาพ ตรวจสอบฤทธิ์ด้านเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองเพื่อดูว่าให้ผลดีในการรักษาโรคหรือไม่เพียงใด ศึกษาความเป็นพิษและผลข้างเคียงและพบว่ามีผลข้างเคียงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์ ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาวิจัยและนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรมและการแพทย์ตลอดจนอุตสาหกรรมอาหารมากมาย แต่ทั้งนี้ยังมีสารสกัดทางธรรมชาติที่ยังไม่ได้มีการศึกษาวิจัย จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดทางธรรมชาติชนิดอื่นเพื่อหาส่วนประกอบที่มีอยู่ในสารธรรมชาตินั้นๆ เพื่อเป็นการวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ที่อาจมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมากกว่าหรือเป็นเพียงอีกทางเลือกหนึ่งในการสกัดสารที่มีสมบัติเดิมจากสารธรรมชาติตัวใหม่[1] นอกเหนือจากการนำสารสำคัญมาใช้ในการรักษาโรค ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามหาหนทางนำพืชหรือจุลินทรีย์ต่างๆมาสกัด เพื่อหาสารสำคัญกลุ่มใหม่เพื่อนำมาพัฒนาใช้ในทางการเกษตร เนื่องจากเป็นสารสำคัญเหล่านี้มีรายงานการวิจัยสนับสนุนว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์[2]

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ การสกัดแยกสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง โดยดาวเรืองที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีลักษณะพิเศษคือจะเน้นในเรื่องของแหล่งการปลูกที่เป็นการปลูกในแปลงแบบเกษตรอินทรีย์ ไม่มีการใช้สารเคมีใดๆในการเร่งการเจริญเติบโตของต้นหรือดอก ดาวเรืองหรือ Marigold มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tagetes erecta* L. เป็นพืชสกุล Tagetes และจัดอยู่ในวงศ์ Compositae ลักษณะโดยทั่วไปเป็นไม้ดอกพันธุ์ที่ใช้เป็นการค้าในประเทศไทยได้แก่ พันธุ์ซอเวอร์เรน (sovereign) มีกลิ่นหอม กลีบดอกดาวเรืองมีสารสีเหลืองที่เรียกว่า xanthophyll สูง จึงนิยมนำมาปลูกเพื่อตัดดอก แล้วนำไปสกัดสารที่สำคัญในทางการแพทย์และเภสัชกรรมรวมถึงอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางต่างๆ รัฐตะวันและคณะ[3]ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่างๆของดาวเรืองพบว่าส่วนใบประกอบด้วยสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) หลายชนิด และสารยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ (allelochemicals) ส่วนดอกออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือต้านออกซิเดชันที่ดีและมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด และส่วนเมล็ดออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์บ้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เล็กน้อย ทั้งนี้เพื่อเป็นการต่อยอดงานวิจัย ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาการสกัดแยกสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง โดยใช้เทคนิคทางเคมีอินทรีย์ เริ่มจากการนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) โดยใช้หลักความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ ทำการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบกับ BHT (Butylated hydroxytoluene) แยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างสารสำคัญด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาการสกัดแยกสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง

1.2.2 เพื่อแยกสารต้านออกซิเดชันในรูปสารบริสุทธิ์

1.2.3 เพื่อศึกษาหาโครงสร้างสารต้านออกซิเดชันและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 จัดหาดอกดาวเรือง (*T. erecta* L.)

1.3.2 นำดอกดาวเรืองมาเด็ดเป็นกลีบ คัดแยก นำไปตากแห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด

1.3.3 นำดอกดาวเรืองมาสกัดด้วยเมทานอล โดยวิธีการแช่หมัก (maceration) แล้วนำของเหลวผลกรองที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกได้ส่วนที่เรียกว่า สารสกัดหยาบ (Crude extract)

1.3.4 นำสารสกัดหยาบเมทานอลจากข้อ 1.3.3 มาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction)

1.3.5 นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพื่อทราบถึงชนิดของสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด

1.3.6 นำสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดมาแยกสารต้านออกซิเดชันในรูปสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

1.3.7 นำสารบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1.3.8 วิเคราะห์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงชนิดของสารต้านออกซิเดชันที่เป็นองค์ประกอบในดอกดาวเรือง

1.4.2 ทราบถึงศักยภาพของดอกดาวเรืองที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยารักษาโรค และเครื่องสำอาง 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[4] โดยมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นอย่างมาก ทำให้นักเคมีหรือนักวิทยาศาสตร์สาขาอื่นๆ สนใจที่จะศึกษาหาแนวทางในการสกัดสารต่างๆ จากธรรมชาติโดยเฉพาะสมุนไพร เพื่อค้นหาผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลทางชีวภาพ (Biologically active substances) ที่สามารถนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ โดยนักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product chemist) พยายามสกัดและแยกสารอินทรีย์ต่างๆ ออกมาโดยใช้เทคนิคทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (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 ควันเสียและเขม่าจากเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ และยาฆ่าแมลง เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกทำลายหรือลดความรุนแรงได้ด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) โดยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ดังนั้นการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจอย่างมาก โดยสามารถนำไปในการใช้ป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคและปัญหาต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น

2.1 สารสำคัญในพืชสมุนไพร[5]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีในพืชสมุนไพร จำแนกได้เป็น 2 จำพวกคือ

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

2. สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เป็นสารประกอบที่มีลักษณะค่อนข้างพิเศษต่างกันในพืชแต่ละชนิด คาดว่าสารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ในพืช ซึ่งกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารเคมีแต่ละชนิดจะมีกระบวนการที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ต่างกัน นอกจากนี้ในแต่ละกระบวนการก็จะใช้เอนไซม์ (enzyme) ที่เฉพาะเจาะจงแตกต่างกันอีกด้วยโดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในพืช ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ น้ำมันหอมระเหย สารในกลุ่มนี้ส่วนมากจะมีสรรพคุณทางยาหรือเป็นสารพิษ[6] สารเคมีในพืชสมุนไพรมีมากมายหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่า สารสำคัญ (active constituents) สามารถนำมาใช้เป็นยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่ม ดังนี้

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

- แป้ง ใช้เป็นสารช่วยเพิ่มปริมาณ (diluent) และสารช่วยการแตกตัวยาเม็ด (disintegrating agent)

- กัมอะคาเชียและกัมทรากาคานธ์ (acacia gum และ tragacanth gum) เป็นสารที่ต้นไม้สร้างขึ้นเมื่อได้รับอันตรายหรือเป็นแผลจากต้นอะคาเชียและต้นแอสตรากาลูส ใช้เป็นสารช่วยแขวนตะกอน (suspending agent) สารช่วยยึดเกาะในยาเม็ด (binding agent) ทำให้ชุ่มคอ (demulcent)

- น้ำผึ้ง ประกอบด้วยกลูโคส (glucose) **1** และฟรุกโทส (fructose) **2** เป็นส่วนใหญ่ ใช้เป็นส่วนประกอบในยาแก้ไอ ใช้เตรียมน้ำเชื่อมและมีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อนๆ

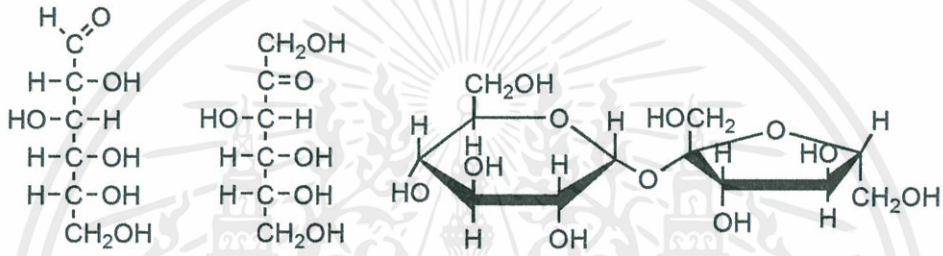
- วุ้น (agar) เป็นสารจำพวกคอลลอยด์ (colloid) ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง ประกอบด้วยอะกาโรส (agarose) ซึ่งเป็นส่วนทำให้วุ้นแข็งตัว และอะกาโรเพกทิน (agaropectin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวกับความหนืดของวุ้น ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (stabilizing agent) สารช่วยในการเตรียมอิมัลชัน (emulsifying agent) และใช้เป็นยาระบาย

- น้ำตาลทราย (sucrose) **3** พบมากในบีทรูทและอ้อย ฯลฯ ใช้เป็นสารแต่งรสหวาน (sweetening agent) และใช้เตรียมน้ำเชื่อม

- เซลลูโลส (cellulose) และอนุพันธ์เซลลูโลส จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืช ในทางเภสัชกรรมใช้อนุพันธ์ของเซลลูโลส ได้แก่ เมทิลเซลลูโลส (methyl cellulose, MC) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, C.M.C.) เป็นยาระบายชนิดช่วยเพิ่มกาก (bulk laxative) และเป็นสารช่วยแขวนตะกอน เป็นต้น



Glucose 1 **Fructose 2** **Sucrose 3**

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

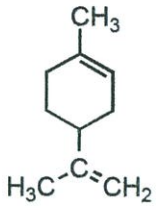
- น้ำมันถั่วเหลืองหรือน้ำมันข้าวโพด ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับยาฉีด ใช้เตรียมอิมัลชัน (emulsion) และใช้เป็นอาหาร

- น้ำมันมะกอก ใช้เป็นสารหล่อลื่น (emollient) และใช้เป็นยาระบาย เป็นต้น

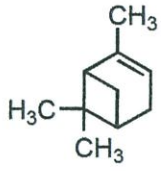
3. น้ำมันหอมระเหย (volatile oils หรือ essential oils หรือ ethereal oils) พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิธรรมดา ไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งไว้นานๆ อาจถูกออกซิไดส์ (oxidised) ทำให้สีเข้มขึ้น จึงต้องเก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

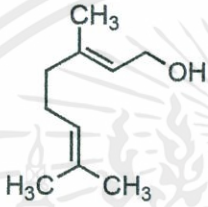


Limonene 4

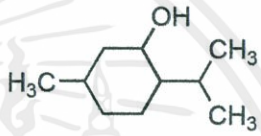


Pinene 5

3.2 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก (alcohol volatile oils) เช่น จีรานิออล (geraniol) **6** ในน้ำมันดอกกุหลาบ (rose oil), เมนทอล (menthol) **7** ในน้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil) เป็นต้น

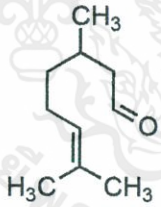


Geraniol 6

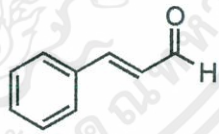


Menthol 7

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

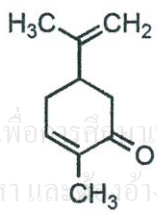


Citronellal 8



Cinnamaldehyde 9

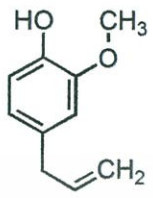
3.4 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกคีโทนเป็นองค์ประกอบหลัก (ketone volatile oils) เช่น คาร์โวน (carvone) **10** ในน้ำมันเทียนตากบ (caraway oil) เป็นต้น



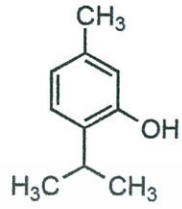
Carvone 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

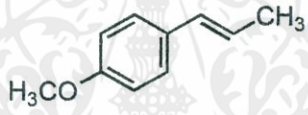


Eugenol 11



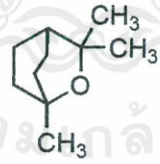
Thymol 12

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



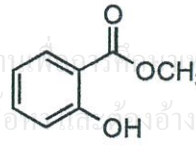
Anethole 13

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



Eucalyptol 14

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



Methyl salicylate 15

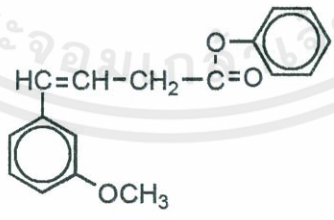
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 โดยกำยานไทยประกอบด้วยผลึกโคนิเฟอริลเบนโซเอต (coniferyl benzoate) **16** ใช้แต่งกลิ่นเครื่องสำอาง ส่วนกำยานสุมาตราใช้ทางยาเป็นองค์ประกอบในคอมพาวด์เบนซอยด์ทิงเจอร์และใช้มากในอุตสาหกรรมแลกเกอร์



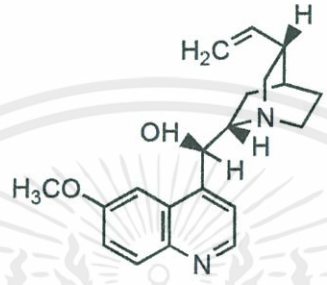
Coniferyl benzoate 16

5. แอลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่มากที่สุดกลุ่มหนึ่งที่ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง พบมากในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ คุณสมบัติทั่วไปของแอลคาลอยด์ คือ มักมีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

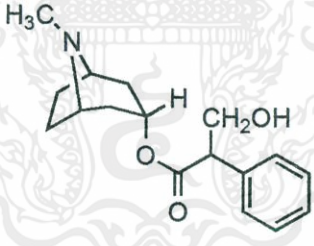
อินทรีย์ มีคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมาก

5.1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย เช่น ควินิน (quinine) **17** จากเปลือกต้นซิงโคนา (*Cinchona succirubra* Pav.) ในวงศ์รูเบียซีอี (Rubiaceae) ใช้รักษาไข้มาลาเรียจากเชื้อ พลาสโมเดียมฟาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) ซึ่งดื้อต่อยาสังเคราะห์คลอโรควิน (chloroquine)



Quinine 17

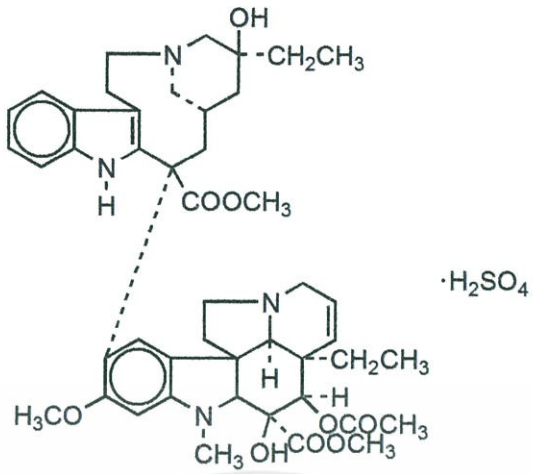
5.2 มีฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น อะโทรพีน (atropine) **18** จากใบเบลลาดอนนา (*Atropa belladonna* L.) ในวงศ์โซลานาซีอี (Solanaceae) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ จึงใช้เป็นยารักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้โดยใช้ร่วมกับยาลดกรด (antacid)



Atropine 18

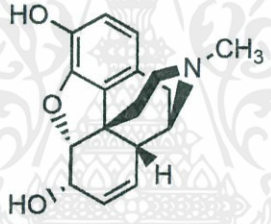
5.3 ใช้ต้านมะเร็ง (anticancer) เช่น วินบลาสทีนซัลเฟต (vinblastine sulfate) **19** และวินคริสทีนซัลเฟต (vincristine sulfate) จากลำต้นเหนือดินของแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.) ในวงศ์เอโพไซนาซีอี (Apocynaceae)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



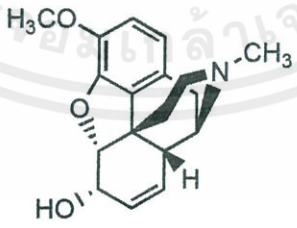
Vinblastine sulfate 19

5.4 ฤทธิ์ระงับอาการปวด (analgesic) เช่น มอร์ฟีน (morphine) **20** จากยางฝิ่น (*Papaver somniferum* L.) ในวงศ์พาพาเวอราซีอี (papaveraceae) ใช้ระงับปวดในการผ่าตัดต่างๆ และใช้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะสุดท้าย แต่มีฤทธิ์เสพติด



Morphine 20

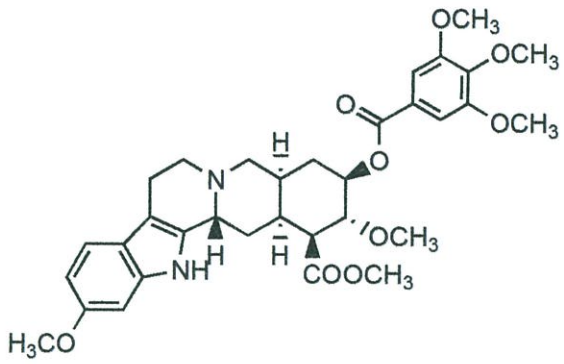
5.5 ฤทธิ์ระงับอาการไอ เช่น โคเดอีน (codeine) **21** จากยางฝิ่น ออกฤทธิ์กดศูนย์ไอในสมอง (cough center) มีฤทธิ์เสพติด



Codeine 21

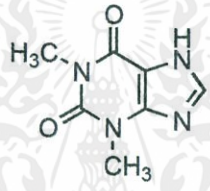
5.6 ฤทธิ์ลดความดันโลหิต เช่น เรสเซอพีน (reserpine) **22** จากรากต้นระย่อมน้อย (*Rauvolfia serpentina* Benth. Ex Kurz.) ในวงศ์เอโพไซนาซีอี หรือควินิดีนซัลเฟต (quinidine sulfate) จากเปลือกต้นซิงโคนา (*Cinchona succirubra* Pav.) ในวงศ์รูเบียซีอี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น และห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



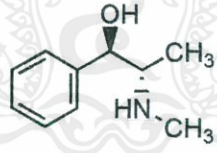
Reserpine 22

5.7 ฤทธิ์ขยายหลอดลม (bronchodilator) เช่น ทีโอฟิลลีน (theophylline) **23** จากยอดและใบของชา (*Camellia sinensis* O. Kunze) ในวงศ์ทีอาซีอี (Theaceae)



Theophylline 23

5.8 ฤทธิ์ลดน้ำมูก แก้หวัด (decongestant) เช่น อีฟรีดรีน (ephedrine) **24** จากต้นของมั่งอึ๊งหรือมาฮวง (*Ephedra equisetina* Bunge) ในวงศ์นีทาซีอี (Gnetaceae)



Ephedrine 24

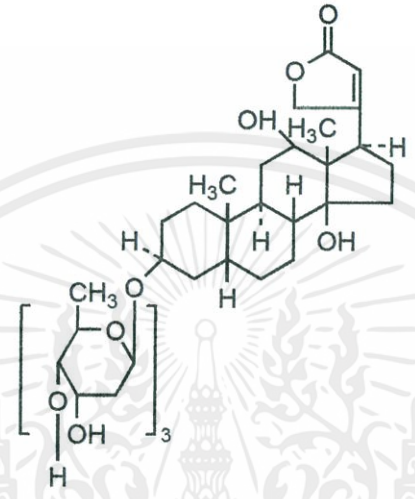
5.9 ฤทธิ์อื่นๆ

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่า แอลคาลอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาครอบคลุมเกือบทุกระบบของร่างกายและจัดเป็นเภสัชภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ได้นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

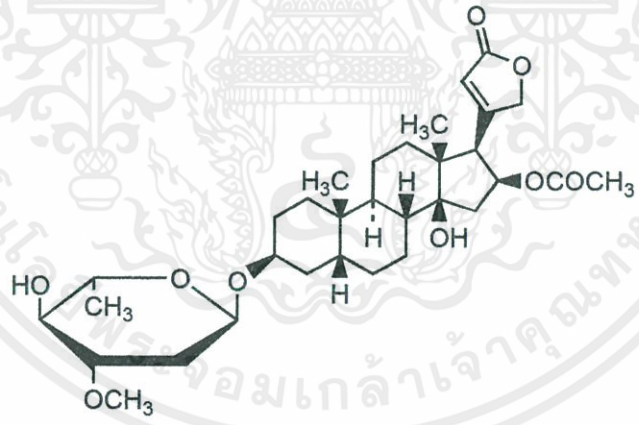
6. ไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วน อะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลหรือเรียกส่วนไกลโคน (glycone) จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวาง และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ โดยทั่วๆ ไปไกลโคไซด์จะละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นกับจำนวนและชนิดน้ำตาลของโครงสร้างไกลโคนของไกลโคไซด์ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเกิดการสลายพันธะที่เชื่อมต่อระหว่างอะไกลโคนและไกลโคน ตัวอย่างไกลโคไซด์เช่น ดิจอกซิน (digoxin) **25** จากใบของพืชสกุลดิจิทาลิส (*Digitalis lanata* Ehrh.) มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด ใช้รักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติของหัวใจหรือโอลีแอนดริน (oleandrin) **26** จากใบยี่โถ (*Nerium incidum* Mill) มีฤทธิ์เช่นเดียวกับดิจอกซิน เป็นต้น



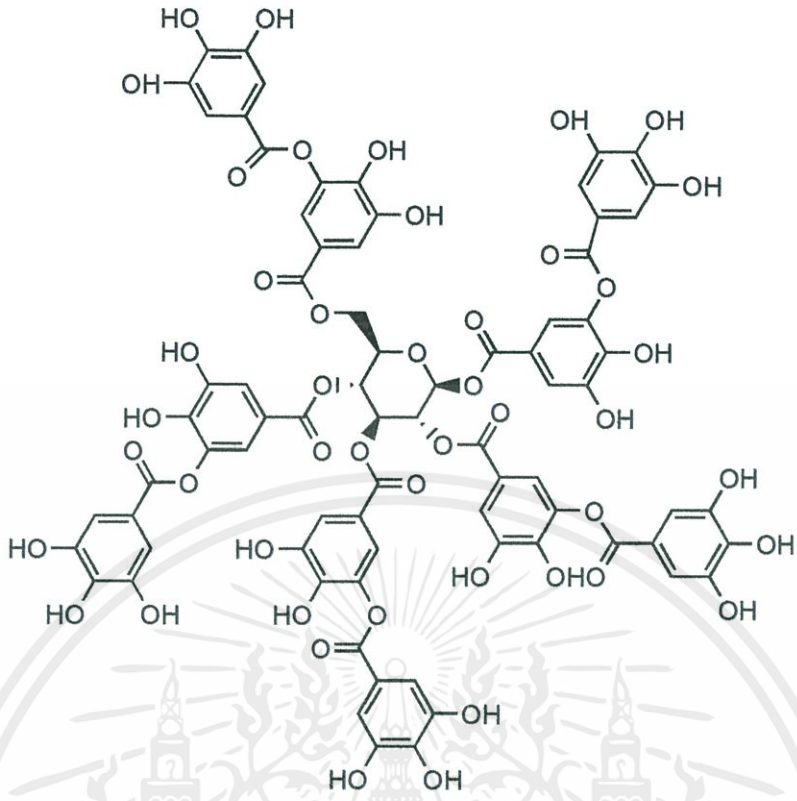
Digoxin 25



Oleandrin 26

7. แทนนิน (tannins) เป็นสารพวกพอลิฟีนอล (polyphenol) มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน พบได้ในพืชหลายชนิด มีรสฝาด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Tannic acid 27

2.2 การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร [7]

ในการนำสารบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรมาใช้จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนต่างๆ คือ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)
2. การสกัด (Extraction)
3. การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)
4. การแยกส่วนประกอบ (Separation)
5. การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญซึ่งต้องคำนึงถึง สิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่

1. การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง
2. ไม่มีพืชอื่นปน เพราะจะทำให้ได้สารแปลกปลอม
3. ไม่มีโรคพืช ถ้าตัวอย่างที่เก็บมามีจุลินทรีย์อันเป็นสาเหตุของโรคพืช จุลินทรีย์อาจให้สารซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่เราต้องการ นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืชได้สารที่แตกต่างออกไปจากธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ความแตกต่างของสารสำคัญในพืช (Variation of plant constituents) ในการเก็บพืชแต่ละครั้งเพื่อนำมาสกัดสารสำคัญในพืชอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น ความแตกต่างเนื่องจากสายพันธุ์ แหล่งที่ปลูก เป็นต้น

5. ผลของการเก็บรักษาและการเตรียมพืช (Effect of preserving and processing process) ในการทำพืชให้แห้งบางครั้งจะทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเสียไป เช่น thyme สดมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ แต่ถ้าตัวอย่างแห้งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานี้จะหมดไป

2.2.2 การเลือกใช้ตัวทำละลาย [5]

หลังจากการเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรสำหรับการสกัดแล้ว ควรเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการสกัด โดยตัวทำละลายดังกล่าวควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีความสามารถในการละลายสารสำคัญมากที่สุดและไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่นๆ ได้น้อย (selectivity) เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งอาจมีโครงสร้างสลับซับซ้อนมากน้อยต่างกันและมีอยู่ในพืชทั้งในสภาพอิสระและรวมตัวกับสารอื่นๆ ในสภาพเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัดนอกเหนือจากความมีขั้วของสารดังกล่าว ในการเลือกตัวทำละลายมีกฎทั่วไปว่า สิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (like dissolve like) เช่น คุณสมบัติสารสำคัญมีขั้วก็ควรเลือกตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกันในการสกัด

2. มีความคงตัวดี และหาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น เมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวอย่างตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่

1. คลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นตัวทำละลายที่ดี แต่มี selectivity น้อย เกิด emulsion ง่าย ถ้าใช้สกัดสารซึ่งเป็นด่างแก่อาจจะสลายตัวให้กรดเกลือ

2. อีเทอร์ (ether) มีอำนาจในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มี selectivity ดีกว่าคลอโรฟอร์ม ข้อเสียคือ ระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิด oxide ได้ง่ายและดูดน้ำได้มาก

3. เฮกเซน (hexane) เหมาะสำหรับพวกสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร ข้อดีคือ ราคาถูก

4. แอลกอฮอล์ (alcohol) ที่ใช้มากคือ เมทานอล (methanol) และเอทานอล (ethanol) เป็น all purpose solvent เนื่องจากมีอำนาจในการละลายกว้างมาก และยังใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวทำละลายอาจจะจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากได้ดังนี้ ไซโคลเฮกเซน, คาร์บอนเตตระคลอไรด์, เบนซีน, อีเทอร์, คลอโรฟอร์ม, อะซิโตน, เอทิลแอซิเตต, เอทานอล, เมทานอล, น้ำ, กรดและเบส

2.2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืช [7]

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

1. การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2. การแช่ (Percolation) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชม. เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆ บรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 ซม. ทิ้งไว้ 24 ชม. จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด รวบรวมสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดแล้วนำไปกรอง

3. การสกัดด้วย Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดรูปชมพู่ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในขวดรูปชมพู่ด้วยวิธีกาลักน้ำ ขวดรูปชมพู่นี้ได้รับความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (heating mantle) ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ในขวดรูปชมพู่ เมื่อตัวทำละลายกระทบตัวควบแน่นจะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

4. การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-liquid Extraction) เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 Extractant lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

4.2 Raffinate lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

5. การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil)

5.1 Resorption เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีดูดซับ โดยมากใช้สกัดกลีบดอก

5.2 Solvent Extraction เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น สกัดน้ำมันกานพลูโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์

5.3 Mechanical Expression เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีบีบ เช่น นำเปลือกผลส้มไปบีบจะได้ water-in-oil emulsion ซึ่งแยกน้ำมันหอมระเหยออกโดยวิธีการหมุนเหวี่ยงสารให้ตกตะกอน (centrifugation)

5.4 Stream Distillation เป็นการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ โดยผ่านไอน้ำลงไปบนสมุนไพรซึ่งบรรจุไว้ในขวดก้นกลมพร้อมกับน้ำ ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยังตัวควบแน่นแล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว เมื่อทิ้งไว้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำ

5.5 Water Distillation เป็นวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรโดยต้มกับน้ำ และน้ำมันหอมระเหยระเหยขึ้นไปถึงตัวควบแน่นจะกลั่นตัว แล้วจึงนำของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมันหอมระเหยจากชั้นน้ำ

6. การสกัดน้ำมันพืช การสกัดน้ำมันพืชจากเมล็ดพืชอาจทำได้โดยใช้ความร้อนหรือไม่ใช้ความร้อนก็ได้ การบีบโดยใช้ความร้อนจะได้น้ำมันออกมามากกว่า แต่จะบริสุทธิ์น้อยกว่า

7. การสกัดสารโดยใช้เครื่องมือ Thermomicro Analysis and Separation Ovens (TAS oven) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมากๆ

2.2.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น [7]

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรโตและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

1. Free Evaporation คือ การระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath หรือ hot plate) บางครั้งอาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Distillation in vacuo เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ เครื่องมือนี้เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)

3. Freezing คือ การแช่แข็ง ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำใช้เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer หรือ freeze dryer) แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งเราแยกจากสารสกัดเข้มข้น (concentrated extract) โดยการหมุนเหวี่ยงสารให้ตกตะกอน (centrifuge)

4. Ultrafiltration เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้เมมเบรนใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000 ดาลตัน

2.4.5 การแยกส่วนผสม [7]

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมี เพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์ จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่างๆ ซึ่งการแยกอาจทำได้โดย

1. Chemical means โดยอาศัยคุณสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมี

2. Physical means เป็นการแยกสารแยกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ อาจใช้วิธีการต่างๆ คือ distillation, stream distillation, sublimation, solvent/solvent precipitation, solvent separation, chromatography, fractional crystallization, centrifugation, electrophoresis และ dialysis โดยงานวิจัยนี้จะใช้วิธี **โครมาโทกราฟี (chromatography)**

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารในระหว่าง phase 2 ชนิด ซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารจะเคลื่อนที่ (migrate) ไปบนเฟสอยู่กับที่โดยการพาของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารจะไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างสาร (solute) กับเฟสอยู่กับที่และระหว่างสารกับเฟสเคลื่อนที่ สารใดที่มีอันตรกิริยากับเฟสอยู่กับที่ได้ดี สารนั้นก็จะเคลื่อนที่ไปได้ช้า อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดโดยกระบวนการต่อไปนี้

1. การดูดซับที่ผิวอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ (adsorption)

2. การดูดซึมเข้าไปในช่องว่าง (pores) ของเฟสอยู่กับที่ (absorption)

3. การกระจายตัว (partition) เข้าไปในของเหลวที่เคลือบอยู่ที่ผิวอนุภาคของเฟสอยู่กับที่หรืออยู่ในช่องว่างของอนุภาคซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการละลายของสาร

4. การสร้าง heteropolar bonds กับไอออนของเฟสอยู่กับที่

5. การระเหย (volatility)

โดยทั่วไปแล้วการแยกไม่ได้ผ่านกระบวนการข้างต้นอย่างใดอย่างหนึ่งแต่อาจผ่านกระบวนการดังกล่าวร่วมกัน เช่น มีทั้งการดูดซับและการดูดซึม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)

มี 2 ชนิด คือ เป็นของแข็งหรือของเหลว ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งเราอาจเรียกว่า ตัวดูดซับ (adsorbent หรือ sorbent) ซึ่งทำหน้าที่ดูดซับสารไว้ชั่วคราว สำหรับเฟสอยู่กับที่ที่เป็นของเหลว

บางครั้งอาจเคลือบอยู่บนเม็ดของแข็งซึ่งเฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา (inert) โดยตัวดูดซับที่ใช้กันมากได้แก่

1. ซิลิกาเจล (Silica Gel หรือ Kieselgele)
2. อะลูมินา (Alumina)
3. Kieselguhr หรือ Diatomaceous earth หรือ Diatomite หรือ Bacillarieae earth
4. เซลลูโลส (Cellulose) และอนุพันธ์
5. ถ่าน (Charcoal) และคาร์บอน (Carbons)
6. ดินขาว (Clays) และ related substance
7. พอลิเอไมด์ (Polyamide)
8. ตัวดูดซับที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อใช้ในไอออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion exchange chromatography)

การเลือกตัวดูดซับ

ในการเลือกตัวดูดซับเราต้องคำนึงถึงคุณสมบัติต่อไปนี้

1. คุณสมบัติในการละลายของสาร ว่าสารที่จะแยกเป็นสารมีขั้วหรือไม่มีขั้ว
2. ความเป็นกรด ด่าง หรือเป็นกลางของสารที่จะแยก
3. ปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างตัวดูดซับกับสารหรือสารกับตัวทำละลาย

โดยทั่วไปสารที่ชอบน้ำ (hydrophilic) จะใช้ตัวดูดซับต่อไปนี้คือ cellulose, kieselguhr และ polyamide ถ้าเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะใช้ alumina, silica gel และ acetylated polyamide layer

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

อาจจะเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ ถ้าเป็นของเหลวอาจเรียกว่า solvent, wash liquid, developer หรือ eluent ก็ได้ เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในทางโครมาโทกราฟีควรจะเป็นตัวทำละลายที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ เช่น chromatographic grade ถ้าใช้ analytical grade อาจจะต้องนำไปกลั่นในเครื่องกลั่นที่ทำด้วยแก้วครั้งหนึ่งก่อน หรือผ่าน alumina column โดยเฉพาะในกรณีของโครมาโทกราฟีบางอย่าง เช่น high pressure liquid chromatography

ตัวทำละลายที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. Isocratic เป็นตัวทำละลายเดี่ยว หรือเป็นส่วนผสมของตัวทำละลาย
2. Gradient เป็นการใช้ตัวทำละลายซึ่งส่วนผสมของตัวทำละลายเปลี่ยนตลอดเวลาที่ทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน normal phase chromatography การ development หรือ elution นั้น เราจะค่อยๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลายขึ้นไปเรื่อยๆ ตัวทำละลายจะมีความมีขั้วจากน้อยไปมากดังนี้ ปิโตรเลียมอีเทอร์, ไซโคลเฮกเซน, คาร์บอนเตตระคลอไรด์, ไตรคลอโรเอทิลีน, โทลูอีน, เบนซีน, ไดคลอโรมีเทน,

คลอโรฟอร์ม, ไดเอทิลอีเทอร์, เอทิลแอซิเตต, อะซิโตน, เอ็น-โพรพานอล, เอทานอล, เมทานอล และน้ำ

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer Chromatography : TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้เฟสอยู่กับที่ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว อลูมิเนียมหรือพอลิเอทิลีน เมื่อหยดสารผสมลงบน Stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่แทงค์ซึ่งบรรจุเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบนเฟสอยู่กับที่ซึ่งเรียกว่า Development ขณะที่เกิด development สารก็จะแยกออกจากกัน กลวิธีในการแยกจะมีทั้งการดูดซับ (adsorption) และการกระจายตัว (partition) แต่จะมีกลวิธีใดมากกว่าขึ้นกับว่าแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นนั้นถูกนำไป activate หรือไม่ การ activate แผ่น TLC โดยอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จะทำให้น้ำระเหยออกไปจากอนุภาคของตัวดูดซับ กลวิธีจึงเป็นการดูดซับมากกว่าการกระจายตัว แต่ถ้าไม่ได้นำแผ่น TLC ไป activate น้ำที่จับอยู่ที่อนุภาคจะทำหน้าที่เป็น liquid stationary phase จะมีการกระจายตัว (partition mechanism) เกิดมากกว่าเดิม น้ำที่เคลือบอยู่นี้มาจากความชื้นในอากาศนั่นเอง

2.3 การเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย [8]

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ดังนี้

1. ปัจจัยภายในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่า กระบวนการเมทาบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

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

1) ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$RH + \text{initiator} \xrightarrow[T]{\text{light}} R\bullet + H\bullet \qquad (1)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ดังสมการ

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

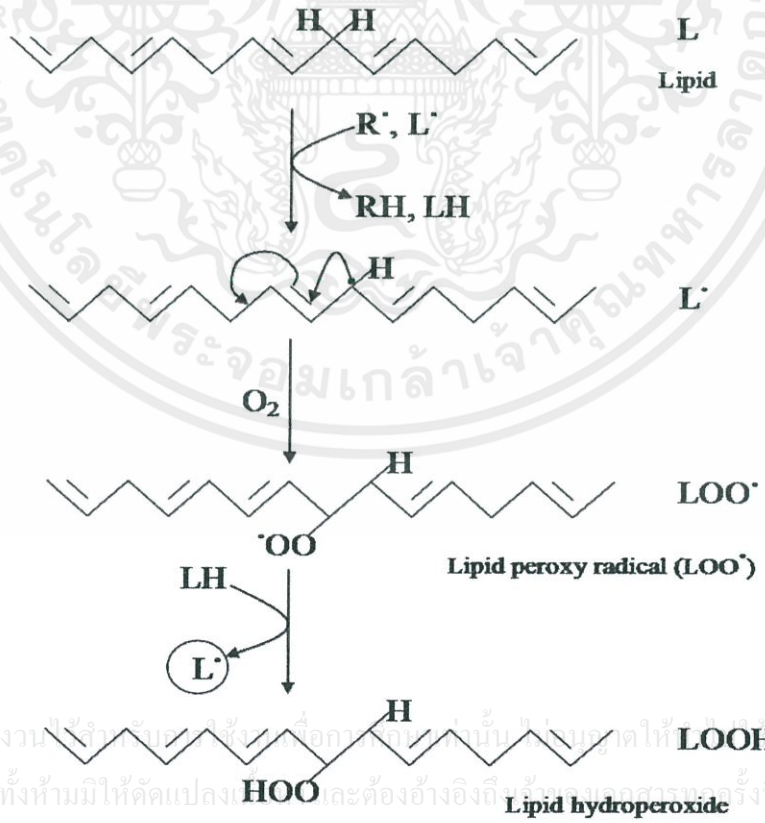
$$ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet \qquad (2.2)$$

3) ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ

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

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

กลไกการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เริ่มต้นเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว (LH) ถูกอนุมูลอิสระ (R•) ดึงไฮโดรเจนออก ทำให้เกิดอนุมูลอิสระบนอะตอมคาร์บอนของลิพิด และเกิดอนุมูลลิพิด (L•) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้อย่างรวดเร็วเกิดเป็นอนุมูลลิพิดเปอร์ออกซี (LOO•) และทำปฏิกิริยาต่อไปกับลิพิดโมเลกุลอื่นๆ เกิดลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (LOOH) กับอนุมูลลิพิด (L•) ใหม่ๆ เพิ่มเข้าสู่วงจร และอนุมูลลิพิดที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่กับลิพิดโมเลกุลอื่นๆ ต่อไปเรื่อยๆ (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ในที่สุด [9]



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 กระบวนการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว[9]

2. ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็งเช่น บลีโอไมซิน (bleomycin), แอนทราไซคลินส์ (antracyclines) และ เมโธทรีเสต (methotrexate) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidation)

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

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

โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นร่างกายจำเป็นต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น โดยสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือระบบแอนตี้ออกซิแดนท์ (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (substrate)ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยสาร (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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สารต้านออกซิเดชัน [10]

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

สมบัติของสารต้านออกซิเดชันที่ดี ได้แก่

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) ต้นไทม์ (Thyme) ขมิ้น (Turmaric) เป็นต้น

กลไกการทำงานของสารต้านออกซิเดชัน

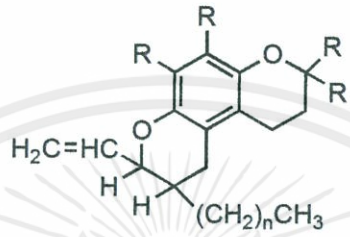
หน้าที่สำคัญที่สุดของสารต้านออกซิเดชันในอาหาร คือ ยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง ในกรณีที่ไม่ใช่อาหาร เช่น ในน้ำมันรถยนต์ (Gasoline) น้ำมันหล่อลื่น (Lubrications) ยาง (Rubber) และสารอื่นๆ สารต้านออกซิเดชันจะทำหน้าที่เป็น Peroxide decomposers

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

R•	+	A-H	---------->	R-H	+	A•
RO•	+	A-H	---------->	R-O-H	+	A•
ROO•	+	A-H	---------->	R-O-O-H	+	A•
R•	+	A•	---------->	R-A		
RO•	+	A•	---------->	R-O-A		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมการของปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าสารต้านออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน ทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระลดน้อยลง และมีสารประกอบที่เกิดขึ้นใหม่ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันกับออกซิไดส์ลิพิด ตัวอย่างเช่น การใช้วิตามินอีหรือโทโคฟีรอลเป็นสารต้านออกซิเดชันให้แก่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในน้ำมัน จะพบว่ามีสารประกอบของ Tocopherol-linoleic acid **28** เกิดขึ้น ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



Tocopherol-linoleic acid 28

ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่ใช้เติมลงในอาหารมีความสำคัญมาก เนื่องจากต้องคำนึงถึงราคา ความปลอดภัย กลิ่น รสชาติ และความสามารถในการทำหน้าที่ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ต้องนำมาเกี่ยวข้องด้วย ความสามารถในการทำหน้าที่ของสารต้านออกซิเดชันมีความแปรผกผันมาก สารต้านออกซิเดชันบางชนิดจะทำหน้าที่ต้านออกซิเดชันได้ดีขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น บางชนิดให้ผลดีที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ เท่านั้น การใช้ปริมาณที่มากเกินไปหรือมีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจกลายเป็นโปรออกซิแดนซ์ (Pro-oxidant) ได้

สารต้านออกซิเดชันที่ใช้ในอาหาร

สารต้านออกซิเดชันที่ใช้เติมลงในอาหารส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ ได้แก่

1. Butylated hydroxyanisole (BHA) เป็นส่วนผสมของ 2-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole **29** และไอโซเมอร์ของมัน คือ 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole **30**

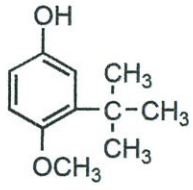
2. เอสเทอร์ของ Gallic acid คือ Propyl gallate (PG) **31**

3. Butylated hydroxytoluene (BHT) หรือ 2, 6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol **32**

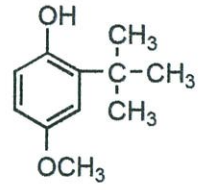
4. Di-*tert*-butyl hydroxyquinone (TBHQ) **33**

สารต้านออกซิเดชันดังกล่าวนิยมใช้มากในอาหาร และได้รับการรับรองจาก US-FDA ว่าปลอดภัย สูตรโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน มีดังนี้

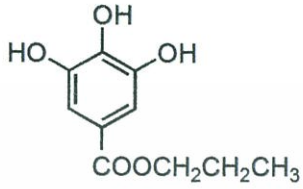
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



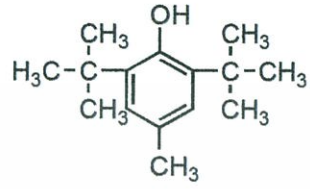
2-tert-butyl-4-hydroxyanisole 29



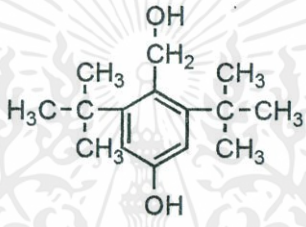
3-tert-butyl-4-hydroxyanisole 30



Propyl gallate (PG) 31



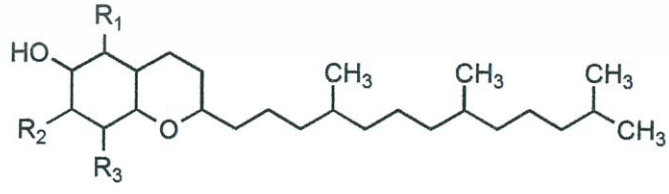
2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol 32



Di-tert-butyl hydroxyquinone (TBHQ) 33

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

โทโคฟีรอล (Tocopherols) **34** ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติ ให้กับสิ่งมีชีวิตในเซลล์และเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ ปริมาณโทโคฟีรอลที่เหลืออยู่ในน้ำมันพืชภาพหลังที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันให้แก่น้ำมัน นอกจากนั้นสารพวกเลซิทินและฟอสฟาไตด์ก็มี antioxidant activity ด้วย รวมทั้งสารพวกฟลาโวน (flavones) สเตอรอล และ sulfhydryl compounds [11]



Tocopherols 34

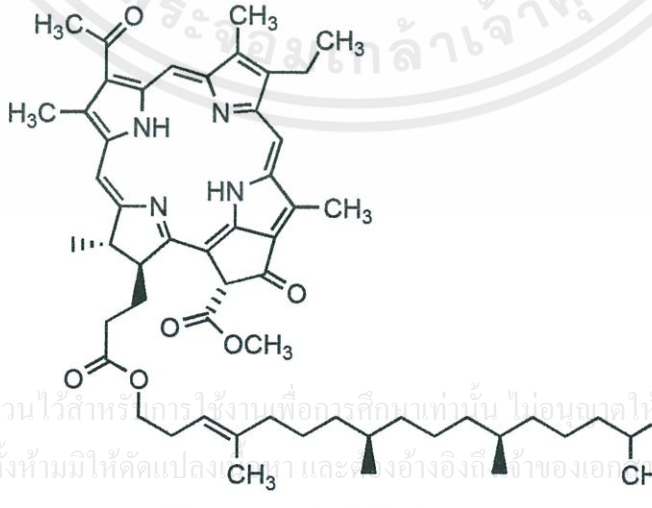
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. แคโรทินอยด์ เป็นสารที่ให้สีส้มและสีเหลืองที่พบในพืช ในพืชผักใบสีเขียวเข้มหลายชนิดมีแคโรทินอยด์สูง เพียงแต่มองไม่เห็นสีส้มเนื่องจากถูกสีเขียวของสารคลอโรฟิลล์บดบังไว้จนหมด สารกลุ่มแคโรทินอยด์มีอยู่มากถึง 600 ชนิด

สารกลุ่มนี้หลายชนิดทำงานในลักษณะของสารต้านออกซิเดชัน มีคุณสมบัติป้องกันมะเร็งที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระได้ สารกลุ่มนี้หลายชนิดแสดงคุณสมบัติของสารเริ่มต้นสร้างวิตามินเอ อย่างเช่น เบตาแคโรทีน (β-Carotene) **35** ซึ่งเป็นสารสีส้มที่พบมากในผักผลไม้หลายชนิด

β-Carotene 35

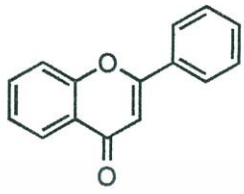
2. คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) 36 เป็นสารเคมีพืชหรือพฤกษเคมีสำคัญอีกตัวหนึ่ง เรากินผักสีเขียวก็ได้ประโยชน์จากคลอโรฟิลล์เข้าไปด้วย คลอโรฟิลล์เป็นสารสีเขียวที่พบมากในพืช มีการนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมานาน สารในกลุ่มนี้มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ตัวที่สำคัญได้แก่ คลอโรฟิลล์กับคลอโรฟิลลิน มีรายงานทางการแพทย์ว่า สารทั้งสองชนิดนี้ช่วยป้องกันโรคมะเร็งบางชนิดได้ สารคลอโรฟิลลินสามารถรวมตัวกับสารก่อมะเร็งอย่างสารอัฟลาท็อกซิน B1 ให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่หมดฤทธิ์ นักวิทยาศาสตร์พบว่าในอาหารบางชนิดที่มีฤทธิ์ป้องกันมะเร็ง สารคลอโรฟิลล์อาจเข้าไปมีส่วนเกี่ยวข้องอยู่ด้วย อย่างเช่น สารฟีโอไฟติน (pheophytin) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารคลอโรฟิลล์พบในชาเขียวอาจทำร่วมกับสารพฤกษเคมีอื่นๆ ในกลุ่มฟีนอลเสริมฤทธิ์ในการป้องกันมะเร็งก็ได้



Chlorophyll 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

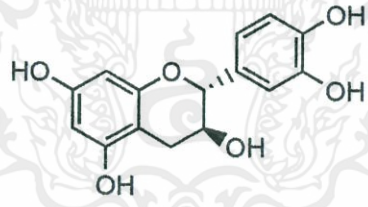
3. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) 37 เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่พบได้ในผักและผลไม้ กลุ่มนี้สำคัญมากและมีอยู่ด้วยกันหลายฟอร์ม เช่น ฟลาวานอล ฟลาวาโนน แอนโธไซยานิดินส์ ฟลาโวนส์ และฟลาโวนอลส์



Flavonoids 37

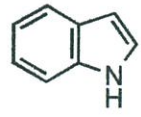
สารฟลาโวนอยด์ตัวที่พบว่าช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชัน อย่างเช่น รูทิน มอริน คะเตชิน เกอเซติน ฟิเซอติน และกอสสิเปติน สารพวกนี้พบในพืชหลายชนิดที่กลายเป็นพืชผักชื่อดังไปแล้ว อย่าง ชาเขียว ไวน์แดง หัวหอม กระเทียม

4. สารคะเตชิน (Catechin) 38 เป็นสารประกอบทางเคมีชนิดหนึ่งของโพลีฟีนอล (Polyphenols) ที่รู้จักกันดีในนามของแทนนิน (Tannin) เป็นสารสกัดธรรมชาติจากใบชาเขียวซึ่งอ่อนโยนต่อร่างกายและธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการทำงานหลายๆ อย่างได้ ใช้เป็นยาฝาดสมานแผลชนิดหนึ่ง เช่น ผลลัพธ์ในการลดการเกิดกลิ่น ผลลัพธ์ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยารวมตัวกันกับออกซิเจน



Catechin 38

5. อินโดลส์ (Indole) 39 กะหล่ำรวมถึงพืชผักกลุ่มใกล้เคียงกันที่เรียกว่า กลูซิเฟอรัส อย่างเช่น ผักคะน้า หัวปลี ซึ่งมีสารเคมีอินโดลส์อยู่ในปริมาณพอสมควรที่ทำให้ใช้ป้องกันมะเร็งได้

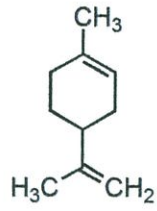


Indole 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งสิ้น

6. กลุ่มสารต้านโปรติเอส ในถั่วเหลือง มะเขือเทศ และพืชบางชนิด ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

7. กลุ่มเทอปีน (Terpene) 40 พบได้ในพืชและผลไม้หลายชนิด ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง



Terpene 40

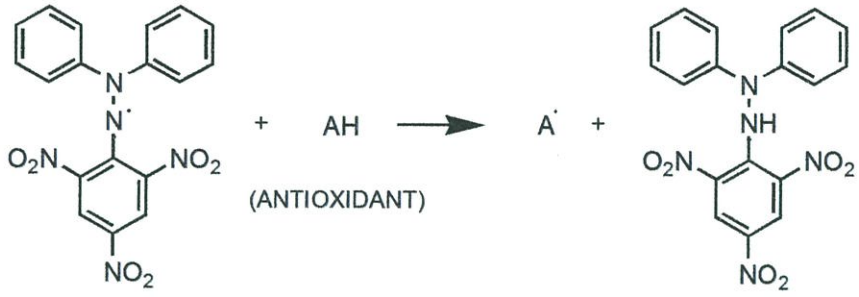
2.4.1 การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Scavenging activity on DPPH radical) [12]

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 บิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) บิวทิเลเตดไฮดรอกซีอะนีโซล (Butylated hydroxyanisole, BHA) หรือแอลฟาโทโคฟีรอล (alpha-Tocopherol) เป็นต้น โดยแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ DPPH โดย DPPH• จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) แสดงดังสมการ

DPPH•	+	AH	---------->	DPPH-H	+	A•
(สีม่วง)		(ตัวอย่างทดสอบ)		(สีเหลือง)		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ DPPH ก่อนและหลังเกิดปฏิกิริยากับ Antioxidant (AH)

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH• ที่แสดงจะเห็นว่าอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรทำให้สารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆ ที่สารต้านออกซิเดชันนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี [13]

2.5 ดาวเรือง[14]

รูปที่ 2.3 ดอกดาวเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำห ญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ อกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ลักษณะคล้ายลิ้น บานแผ่ออก ซ้อนกันหลายชั้นปลายม้วนลง ดอกสมบูรณ์เพศมีลักษณะเป็นหลอดเล็กๆ จำนวนมาก รวมกลุ่มอยู่บริเวณกลางช่อดอก ผลเป็นผลแห้งไม่แตกมีสีดำ

การใช้ประโยชน์ :

- ไม้ประดับ
- สมุนไพร
- สีของดอกใช้เป็นสีย้อมผ้า
- เพื่อจำหน่าย ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ใช้ทำพวงมาลัย ใช้ปักแจกัน
- ป้องกันแมลง เนื่องจากดาวเรืองเป็นสารที่มีกลิ่นเหม็นแมลงไม่ชอบ จึงสามารถใช้เป็นเกราะป้องกันแมลงให้แก่พืชอื่นๆ ในรากของดาวเรืองมีสารชนิดหนึ่งคือ แอลฟาเทอร์เธียนิล (α - terthienyl) ซึ่งเป็นสารที่สามารถควบคุมปริมาณไส้เดือนฝอยในดินได้เป็นอย่างดี
- ดอกดาวเรืองผสมในอาหารสัตว์เป็นอาหารเสริม เนื่องจากดาวเรืองเป็นพืชที่สารแซนโทฟิลส์ (xanthophylls) สูง จึงสามารถนำไปเป็นส่วนผสมอาหารสัตว์ได้ดี โดยเฉพาะอาหารของไก่ไข่ จะทำให้ไข่แดงมีสีแดงสดใสน่ากินยิ่งขึ้น
- สารสกัดจากดอกดาวเรืองจะให้สารสำคัญคือ **ลูทีน (lutein) 41** ซึ่งเป็นสารอาหารในกลุ่มที่เรียกว่า แซนโทฟิลส์ (xanthophylls) มีลักษณะเป็นสารสีเหลือง อยู่ในจำพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีประโยชน์ต่อดวงตาเพราะเป็นสารสำคัญที่อยู่ในจุดรับภาพของดวงตาที่เรียกว่า “มาคูลา (Macula)” สารอาหารลูทีนจะช่วยกรองแสงหรือป้องกันรังสีที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อดวงตา นอกจากนี้ลูทีนยังช่วยปกป้องไม่ให้เซลล์ของจอประสาทตาถูกทำลายและยังช่วยลดความเสี่ยงในการเป็นโรคต้อกระจก (Cataracts) โรคกระจกตาเสื่อม (AMD) ซึ่งชาวต่างประเทศรู้จักสารอาหารลูทีนกันอย่างกว้างขวางว่าเป็นสารอาหารที่ช่วยชะลออาการจอประสาทตาเสื่อมของผู้ใหญ่ จึงมีการศึกษาประโยชน์ของลูทีนที่มีต่อการปกป้องจอประสาทตาเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทของลูทีนที่มีต่อดวงตานั้น พบว่าภายในจอประสาทตาของคนเรามีร่องเล็กๆ อยู่จุดหนึ่งที่มีเซลล์รับภาพจอประสาทตา ซึ่งเป็นจุดที่แสงตกกระทบและทำให้คนเราสามารถมองเห็นภาพที่ชัดเจนในแต่ละวัน ซึ่งบริเวณเซลล์รับภาพนี้มีสารสีเหลืองหรือลูทีนอยู่หนาแน่นมากที่สุด

โดยจะพบได้ตรงชั้นเนื้อเยื่อที่หล่อเลี้ยงเส้นประสาท ซึ่งจุดดังกล่าวเป็นจุดที่สำคัญมากต่อการมองเห็น หากบริเวณดังกล่าวเสื่อมหรือเสียไป อาจทำให้สูญเสียการมองเห็นหรือตาบอดได้ โดยสารลูทีนในเซลล์รับภาพของจอประสาทตานี้ จะทำหน้าที่สำคัญคือ คอยกรองแสงสีฟ้า ซึ่งเป็นอันตรายต่อจอประสาทตา และเป็นแสงที่หลีกเลี่ยงได้ยากเพราะมีอยู่ทั่วไปรอบๆ ตัวเรา ทั้งแสงจากดวงอาทิตย์ แสงจากโทรทัศน์ แสงจากจอคอมพิวเตอร์ แสงจากหลอดไฟ เป็นต้น

นอกจากนี้ลูทีนยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในดวงตาของคนเราอีกด้วย เพราะดวงตาของเราจะมีสารอนุมูลอิสระอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะเป็นตัวทำลายเซลล์รับภาพและทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับจอประสาทตาทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ได้

นอกจากลูทีนจะพบมากในดวงตาของคนเราแล้ว ยังพบได้ในสมองในส่วนที่เกี่ยวกับการมองเห็นถึงร้อยละ 66 จึงเชื่อว่าลูทีนมีส่วนช่วยในการรับภาพและส่งต่อไปยังสมองได้ดีขึ้นอีกด้วย

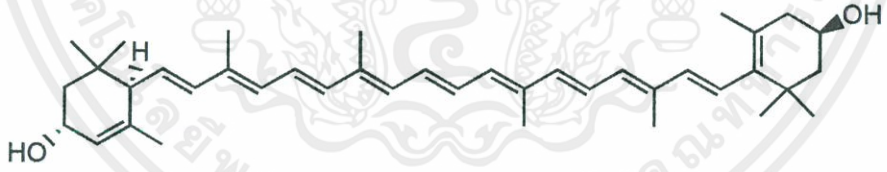
หน้าที่ของลูทีนในการปกป้องดวงตา คือ

1. ป้องกันและชะลอโรคจอประสาทตาเสื่อม โดยเข้าไปดูแลบริเวณจุดรับภาพของดวงตา (Macula) จากการศึกษาพบว่า การรับประทานลูทีนอย่างน้อยวันละ 5 มิลลิกรัม สามารถลดความเสี่ยงของโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

2. ปกป้องอนุมูลอิสระและกรองแสงที่จะมาทำลายดวงตา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคจอประสาทตาเสื่อม

3. ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดบริเวณดวงตา

4. ป้องกันและลดอาการของโรคต้อกระจก [15]



Lutein 41

สรรพคุณทางยา :

<u>ใบ</u> มีสรรพคุณพอกแผลฝี ทาแผลเน่าเปื่อย น้ำคั้นจากใบแก้ปวดหู

<u>ดอก</u> แก้ริดสีดวงทวาร ขับเสมหะแก้เจ็บตา เวียนศีรษะ ไอกรน คางทูม

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cetkovic และคณะ[16] ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรือง โดยการนำสารสกัดหยาบเมทานอลและน้ำของดอกดาวเรือง *Calendula arvensis L.* (GWM) ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า และดอกดาวเรือง *C. officinalis L.* (CM) ซึ่งเป็นพันธ์ปลูก ในช่วงความ

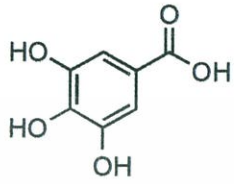
เข้มข้นของ 0.10-0.90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), hydroxyl radical และ lipid peroxyl radical ด้วยกระบวนการ Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy พบว่าสารสกัด CM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัด GMW ขณะที่สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารสกัดจากชั้นน้ำ โดยสารสกัดชั้นน้ำของ CM มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เนื่องจากสารสกัด 0.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) ได้อย่างสมบูรณ์ (100 เปอร์เซ็นต์) 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

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

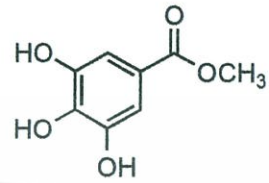
Gong และคณะ[17] ได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดดอกดาวเรืองด้วยแอลกอฮอล์หลายชนิด พบว่าตัวทำละลายที่หลากหลายมีแนวโน้มที่ทำให้ได้ปริมาณของพอลีฟีนอลจากสารสกัดหยาบของดอกดาวเรืองที่ไร้ไขมันแตกต่างกัน โดยชั้นสารสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์ (เอทานอล) / น้ำ (7:3, 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) และองค์ประกอบจากสารสกัดหยาบที่ได้จากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

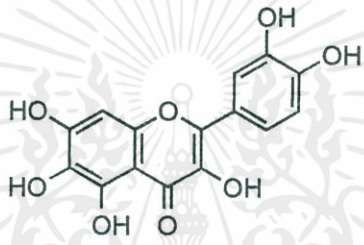
รวมกันของ HPLC–ABTS•+ post-column assay และ HPLC–DAD–MS method พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ Gallic acid **42**, gallicin **43**, quercetagetin **44**, 6-hydroxykaempferol-O-hexoside **45**, patuletin-O-hexoside **46** และ quercetin **47** โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ quercetagetin **44**



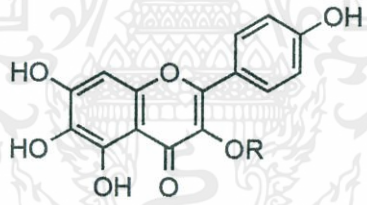
Gallic acid 42



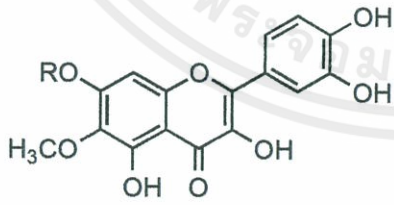
Gallicin 43



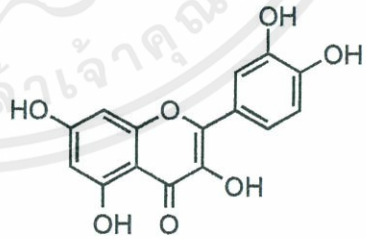
Quercetagetin 44



6-hydroxykaempferol-O-hexoside 45



Patuletin-O-hexoside 46

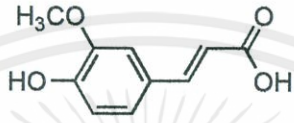


Quercetin 47

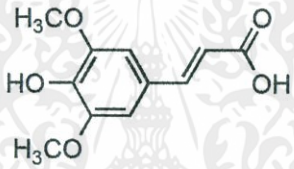
Kaisoon และคณะ[18] ได้ทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของดอกไม้ 12 ชนิดจากประเทศไทยที่สามารถนำมาบริโภคและใช้เป็นส่วนผสมในการปรุงอาหาร ซึ่งพบว่าขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด (TPC) เทียบเท่ากรดแกลลิก (GAE) 88 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนดาวเรือง (*T. erecta*) มีปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid) รวมสูงสุด (TFC) 68.9 mg มิลลิกรัมสมมูลรูทิน/กรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พวงชมพู (*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) โดยสารประกอบกรดฟีนอลที่สำคัญนี้เป็นกรดแกลลิก (gallic acid), กรดเฟรูลิก (ferulic acid) **48** และกรดซิแนพพิค (sinapic acid) **49** ขณะที่มีฟลาโวนอยด์มากกว่าเควอซิทิน (quercetin) **47** และรูทิน (rutin) ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าดอกไม้ที่สามารถบริโภคได้เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระ



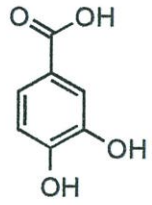
Ferulic acid 48



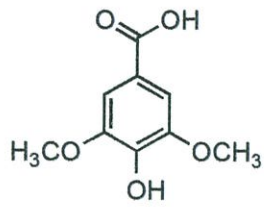
Sinapic acid 49

Siriamornpun และคณะ[19] 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) ในขณะที่ FIR-HA และ FD ให้ปริมาณลูทีน (lutein) และไลโคปีน (lycopene) สูงสุด ส่วนกรดฟีนอลที่สำคัญของดอกดาวเรืองคือ *p*-coumaric acid, ferulic acid และ sinapic acid โดยพบว่ามี gallic acid, protocatechuic acid **50**, syringic acid **51**, caffeic acid **52**, *p*-coumaric acid **53** และ ferulic acid **48** ในปริมาณสูงหลังจากผ่านกระบวนการ FIR-HA แสดงให้เห็นว่า FIR-HA เป็นวิธีการอบแห้งดาวเรืองที่เหมาะสมเพื่อใช้รักษาสี คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพ

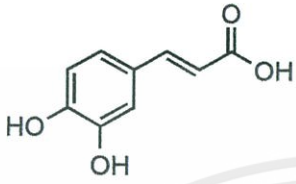
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



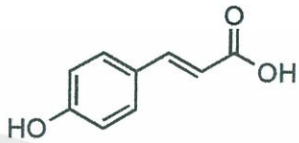
Protocatechuic acid 50



Syringic acid 51



Caffeic acid 52



***p*-Coumaric acid 53**

Hossain และคณะ[20] ได้ทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอินทรีย์ต่างๆ จากใบของพืชเขตร้อน คือ Tetrastigma (เถาอุ่นป่า) จากซาบาห์ โดยการนำใบแห้งของ Tetrastigma มาบดละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต คลอโรฟอร์ม บิวทานอล และเมทานอล แล้วนำน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอินทรีย์ชั้นต่างๆ ที่ได้คือ สารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอซิเตต ชั้นคลอโรฟอร์ม ชั้นบิวทานอลและชั้นเมทานอลมาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic contents) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ 2,2-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงสุด คือ 386.22 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต ชั้นคลอโรฟอร์ม ชั้นเฮกเซนและชั้นบิวทานอล คือ 190.89, 175.89, 173.44 และ 131.72 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนน้ำมันหอมระเหยไม่พบสารประกอบฟีนอล ผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ สารสกัดเมทานอล > สารสกัดเอทิลแอซิเตต > สารสกัดคลอโรฟอร์ม > สารสกัดบิวทานอล > สารสกัดเฮกเซน และน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลในการต้านออกซิเดชัน ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดทั้งหมดสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดนั้น โดยใบของ Tetrastigma ที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลอาจจะเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เฮกเซน	เกรดการค้า	Zen Point
2. ไดคลอโรมีเทน	เกรดการค้า	Zen Point
3. เอทิลแอซิเตต	เกรดการค้า	Zen Point
4. บิวทานอล	เกรดการค้า	Zen Point
5. เมทานอล	เกรดการค้า	Zen Point
6. บิวทีเลตเตดไฮดรอกซีโทลูอีน	เกรดวิเคราะห์	Fluka
7. Folin-Ciocalteu's reagent	เกรดวิเคราะห์	Sigma
8. โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ	เกรดวิเคราะห์	Unilap
9. โซเดียมคาร์บอเนต	เกรดวิเคราะห์	Fisher Scientific
10. ซิลิกาเจล ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร		Scharlau GE0048
11. ซิลิกาเจล ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร		CARLO ERBA
12. ทรายบริสุทธิ์		MERCK

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร
2. ขวดระเหย ขนาด 1 ลิตร
3. บีกเกอร์
4. กรวยแยก
5. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 250 และ 500 มิลลิลิตร
6. หลอดทดลอง ขนาด 16 x 160 มิลลิเมตร
7. ช้อนตักสาร
8. กรวยแก้ว
9. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
10. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC aluminium sheets, silica gel F_{254} MERCK)
11. แท่งแม่เหล็กปั่นกวน
12. หลอดหยดสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
14. เครื่องบดละเอียด
15. คอลัมน์แก้ว
16. กระดาษยูนิเวอร์ซัลอินดิเคเตอร์ (MERCK)
17. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง Denver Instrument Company รุ่น TC-254
18. เครื่องระเหยสุญญากาศ BÜCHI รุ่น Rotavapor R-114
19. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300

3.3 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง

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

3.4 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นำมาใช้ในการสกัดและการทำโครมาโทกราฟีได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะนำมากลั่นที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

การจัดกลุ่มสารสำคัญและการแยกสารให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคือ คอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลของ Scharlau GE0048 ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร และใช้ซิลิกาเจลของ CARLO ERBA ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร สำหรับคลุกสารสกัดหยาบหรือสารที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ใช้ซิลิกาเจล60 F_{254} บนแผ่นอะลูมิเนียม จุดของสารสำคัญพิสูจน์ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร) และใช้รีเอเจนต์ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับสารสำคัญได้แก่ anisaldehyde reagent และvanillin reagent ป้ายบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นนำความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

สเปกตรัม ^{1}H 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เก็บตัวอย่างดอกดาวเรืองโดยคัดดอกที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ ไม่มีโรคและแมลงรบกวน ล้างด้วยน้ำ ผึ่งลมแล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง และนำมาบดให้ละเอียด

2. เตรียมสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล โดยการแช่ดอกดาวเรือง เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 2 ครั้ง กรองแยกกาก และนำของเหลวผลกรองไประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาบเมทานอล

3. จัดกลุ่มสารสำคัญโดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลมาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ (แผนภาพที่ 3.1) และทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดของตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล ตามลำดับ

4. นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นมาหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

5. นำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพที่สุด มาแยกสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

6. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

7. นำสารบริสุทธิ์มาตรวจสอบหาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี

3.6 การเตรียมสารสกัดหยาบเมทานอล

1. นำดอกดาวเรืองแห้งที่บดละเอียด 500 กรัม แช่ด้วยเมทานอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ทำการคนของผสม จากนั้นนำมาอุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

2. กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ได้ของเหลวผลกรองชั้นเมทานอล จากนั้นระเหยเมทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ส่วนกากนำมาแช่ด้วยเมทานอล เช่นเดียวกับข้อ 1

3. นำสารสกัดหยาบเมทานอลมาทำการสกัดแบบแบ่งส่วน ดังแผนภาพที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดหยาบจากดอกดาวเรือง เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Javanmardi และคณะ [21] ทำโดยเตรียมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu's reagent (ของผสมระหว่าง phosphomolybdateและ 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)

3.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกดาวเรือง [22]

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

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

7. ใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันระหว่างสารสกัดดอกดาวเรืองกับสารมาตรฐาน BHT

3.9 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เมื่อวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ นำสารสกัดหยาบในชั้นที่ให้ผลการทดสอบต้านออกซิเดชันดีที่สุดมาแยกออกเป็นสารส่วนย่อย โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีมีวิธีการดังนี้

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

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

3. เตรียม TLC แท็งค์ โดยทำให้ในแท็งค์อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนต่างๆ ที่เตรียมไว้โดยใช้กระดาษกรองวางไว้ด้านในแท็งค์ 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 (Hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีในบริเวณที่เราได้วงไว้ ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เมื่อได้อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม นำมาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

3.10 การเตรียมคอลัมน์และการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยใช้ซิลิกาเจล ขนาด 0.02-0.06 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. จัดกลุ่มสาร โดยรวมสารส่วนย่อยให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยพิจารณาจากแผ่น TLC ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

3.11 การแยกสารส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์ตามวิธีในหัวข้อ 3.10

2. นำสารสกัดหยาบที่ผสมกับซิลกาเจลลงในคอลัมน์โดยไม่ต้องทำการกลั้วขวดก้นกลม ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ประมาณ 700 มิลลิลิตร เป็นตัวชะ จากนั้นทำการเพิ่มขั้วตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องด้วยเอทิลแอซิเตต เพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

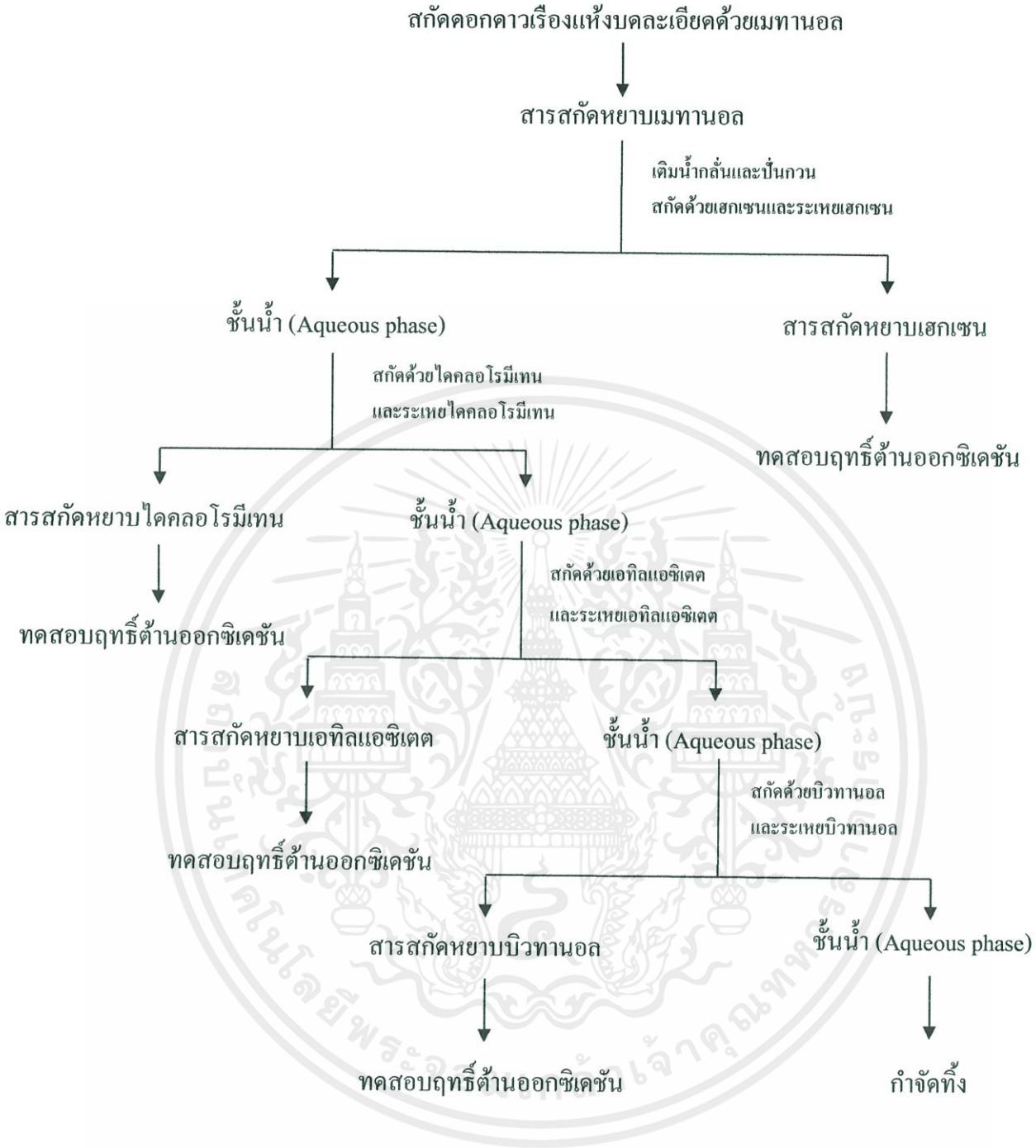
3. เริ่มเก็บสารที่ถูกชะอยู่ห่างจากปลายคอลัมน์ประมาณ 5 เซนติเมตร โดยเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วยขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นจดหมายเลขพร้อมกับทำการตรวจสอบสารในแต่ละขวดด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) ทำการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายและทำการตรวจสอบด้วยการส่องแสงอัลตราไวโอเลต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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เมื่อสารที่ต้องการแยกออกมาให้ทำการจดบันทึกว่า เริ่มออกจากขวดที่เท่าใดและจำนวนเท่าใด รวมสารที่แยกด้วยแผ่น TLC ถ้าสารออกมาเหมือนกันให้ทำการรวมสารละลายที่แยกออกมาได้เข้าด้วยกันแล้วทดสอบ TLC อีกครั้งจึงระเหยตัวทำละลายออก

5. การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ดำเนินกรรมวิธีตามข้อ 3.9 และ 3.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แผนภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี Solvent Partitioning Extraction[23]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

งานวิจัยนี้เตรียมสารสกัดจากดอกดาวเรืองด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยใช้ดอกดาวเรืองแห้งบดละเอียดน้ำหนักเท่ากับ 500.0 กรัม แช่ในเมทานอล กรองแยกกากและของเหลวผลกรอง จากนั้นทำการระเหยเมทานอลออกได้สารสกัดหยาบเมทานอลของดอกดาวเรือง (320.9 กรัม) มีลักษณะของเหลวหนืดเกือบเป็นของแข็งสีเหลืองเข้ม และผลได้ร้อยละคิดเป็น 64.18 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของดอกดาวเรืองแห้ง จากนั้นทำการจัดกลุ่มสารสำคัญ โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลน้ำหนัก 219.00 กรัม มาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ และทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้สารสกัดของตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 8.13, 1.44, 8.86 และ 12.13 กรัม ตามลำดับ และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 3.17, 0.66, 4.04 และ 5.54 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 สารสกัดหยาบทั้งหมดถูกนำไปปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพื่อหาสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุดและนำไปแยกหาสารต้านออกซิเดชันในรูปสารบริสุทธิ์

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักสารสกัดและผลได้เป็นร้อยละ (percentage yield)

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

4.2 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีประสิทธิภาพและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าสารธรรมชาติในกลุ่มอื่นๆ โดยความสามารถในการต้านออกซิเดชันจะขึ้นกับปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดนั้น[20] การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ทั้งหมดของสารสกัดหยาบของดอกดาวเรืองจึงเป็นการทดสอบในขั้นตอนแรกโดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิคในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/น้ำหนักแห้งของสารสกัด พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล มีค่าเท่ากับ 38.389, 7.177, 41.122, 122.388, และ 50.558 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ตามลำดับ สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด คือ 122.388 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีขั้วเนื่องจากประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล(-OH group)ในโครงสร้างจึงเกิดการละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน อย่างเช่น เอทิลแอซิเตต เป็นต้น

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

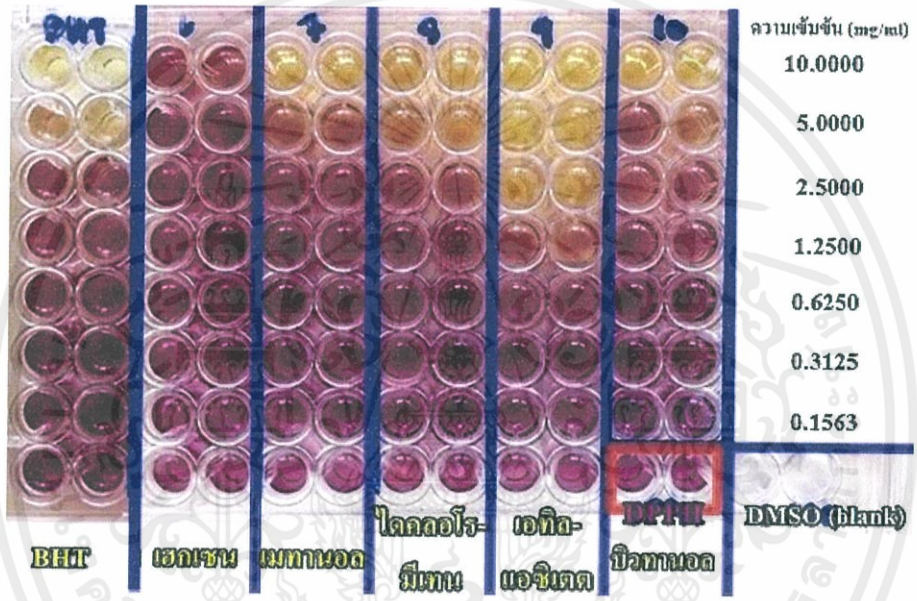
สารสกัดหยาบ	ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด)
เมทานอล	38.389
เฮกเซน	7.177
ไดคลอโรมีเทน	41.122
เอทิลแอซิเตต	122.388
บิวทานอล	50.558

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 ดังรูปที่ 4.1 เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น ทำให้มีปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นด้วย สีม่วงเข้มของสารละลาย DPPH จึงจางลงมากขึ้น โดยเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์คือ บิวทิเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตดไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) เป็นสารมาตรฐานและ DMSO เป็นชุดควบคุม รายงานผลเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณหรือความเข้มข้นสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% จากรูปที่ 4.1 สีของสารละลาย DPPH ผสมกับสารสกัดหยาบเมทานอล สารสกัดหยาบเฮกเซน และสารสกัดหยาบบิวทานอลมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH น้อยที่สุด สีของสารละลาย DPPH ผสมกับสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH ปานกลาง ในขณะที่สีของสารละลาย DPPH ผสมกับสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH มากที่สุด โดยปรากฏหลุมของสารละลายที่เปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลืองมากกว่าหลุมของสารสกัดหยาบอื่น



รูปที่ 4.1 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันในสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

จากตารางที่ 4.3 แสดงค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบเมทานอล ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล ซึ่งมีค่า 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 พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนไม่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แสดงว่าสารต้านออกซิเดชันเป็นสารประกอบที่มีขั้ว เฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วจึงไม่สามารถสกัดสารต้านออกซิเดชันออกมาได้ ส่วนไดคลอโรมีเทนและบิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลางจึงสามารถสกัดสารออกซิเดชันออกมาได้ปานกลาง ส่วนเอทิลแอซิเตตจัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วจึงสามารถสกัดสารต้านออกซิเดชันที่จัดเป็นสารประกอบที่มีขั้วได้ ด้วยเหตุนี้สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตจึงให้ค่า EC_{50} มีค่าต่ำกว่าสารสกัดหยาบอื่นๆ แสดงถึงการมีประสิทธิภาพในการ

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ต้านออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดหยาบอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ทดสอบได้ แสดงให้เห็นถึงผลจากการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัด ทำให้ปริมาณและความหลากหลายของสารต้านออกซิเดชันแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ (ความเป็นขั้ว) ของสารต้านออกซิเดชันนั้น[24]

ตารางที่ 4.3 ค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

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

BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด การทดลองขั้นต่อไปจึงนำสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตมาแยกสารต้านออกซิเดชันในรูปสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีชะสารต้านออกซิเดชันโดยอาศัยหลักการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม และจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยพิจารณาจากการดูดกลืนแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเหมือนและ/หรือต่างกันของการเกิดสีขององค์ประกอบของสารในสารสกัดหยาบที่ปรากฏบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟีเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent และ vanillin reagent รวมจุดสีที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน และทำการระเหยตัวทำละลายออก จากการทดลองนำสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต 6.00 กรัม มาแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยการเปลี่ยนอัตราส่วนความมีขั้วของตัวชะสารระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอซิเตต และจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี สามารถแยกส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบได้ทั้งหมด 7 ส่วน (F_1-F_7) อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต น้ำหนักของสารส่วนย่อย (F_1-F_7) และผลได้คิดเป็นร้อยละ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

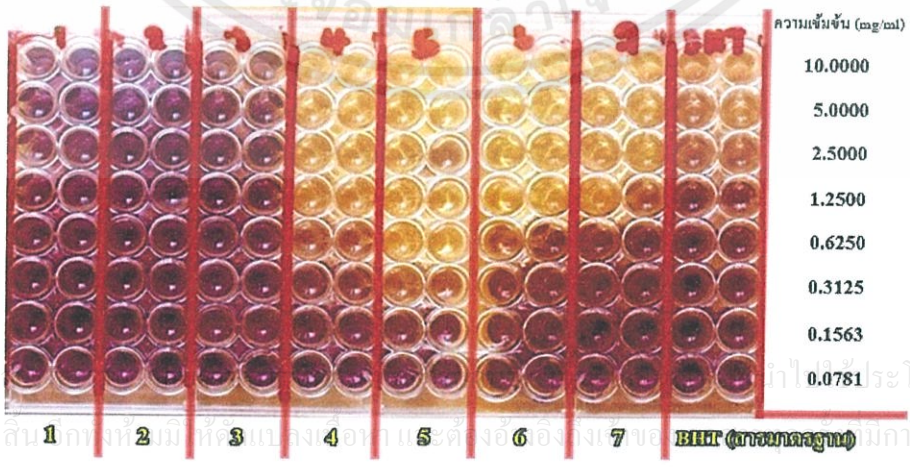
เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การแยกสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต

สารส่วนย่อย	อัตราส่วนระหว่างเฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	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 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ DMSO เป็นชุดควบคุม พบว่าสีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันในสารส่วนย่อย F_1-F_7 แสดงดังรูปที่ 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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันในสารส่วนย่อย 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 ซึ่งแสดงถึงการมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุด

ตารางที่ 4.5 ค่า EC_{50} ของสารส่วนย่อย F_1-F_7

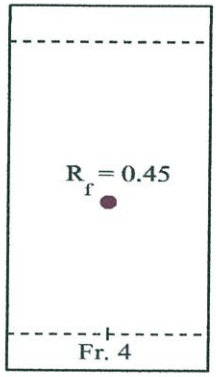
สารส่วนย่อย	EC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
F_1	Inactive
F_2	Inactive
F_3	Inactive
F_4	5.8
F_5	3.0
F_6	5.4
F_7	9.0

BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 การแยกสารต้านออกซิเดชันจากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5

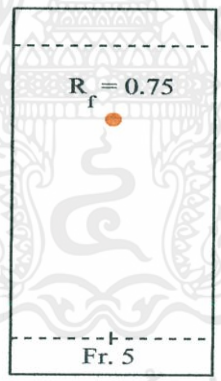
จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารส่วนย่อย F_1-F_7 จากสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต พบว่าสารส่วนย่อย F_5 มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีที่สุด และสารส่วนย่อย F_4 และ F_6 ให้ประสิทธิภาพรองลงมา ทั้งนี้เป็นผลมาจากการใช้อัตราส่วนตัวทำละลายระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอซิเตตที่แตกต่างกันเพื่อเพิ่มความมีขั้ว ทำให้ปริมาณและความหลากหลายของสารต้านออกซิเดชันแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ (ความเป็นขั้ว) ของสารต้านออกซิเดชันนั้น[24] สารส่วนย่อย F_4 และ F_5 ถูกนำมาแยกสารต้านออกซิเดชันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี เมื่อนำสารส่วนย่อย F_4 น้ำหนักเท่ากับ 737.2 มิลลิกรัม พบว่าสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_4 ถูกชะจากคอลัมน์เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต เท่ากับ 40:60 มีค่า R_f เท่ากับ 0.45 ในระบบตัวทำละลายเฮกเซน:เอทิลแอซิเตตเท่ากับ 20:80 ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้จุดสีม่วงชมพูเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent (รูปที่ 4.3) น้ำหนักสารบริสุทธิ์เท่ากับ 24.0 มิลลิกรัม และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 3.27

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 TLC ของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4

และเมื่อนำสารส่วนย่อย F_5 น้ำหนักเท่ากับ 601.0 มิลลิกรัม พบว่าสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_5 ถูกชะจากคอลัมน์เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต เท่ากับ 50:50 มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 ในระบบตัวทำละลายเฮกเซน:เอทิลแอซิเตตเท่ากับ 20:80 ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้จุดสีเหลืองเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent และ vanillin reagent (รูปที่ 4.4) น้ำหนักสารบริสุทธิ์เท่ากับ 405.6 มิลลิกรัม และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 90.82



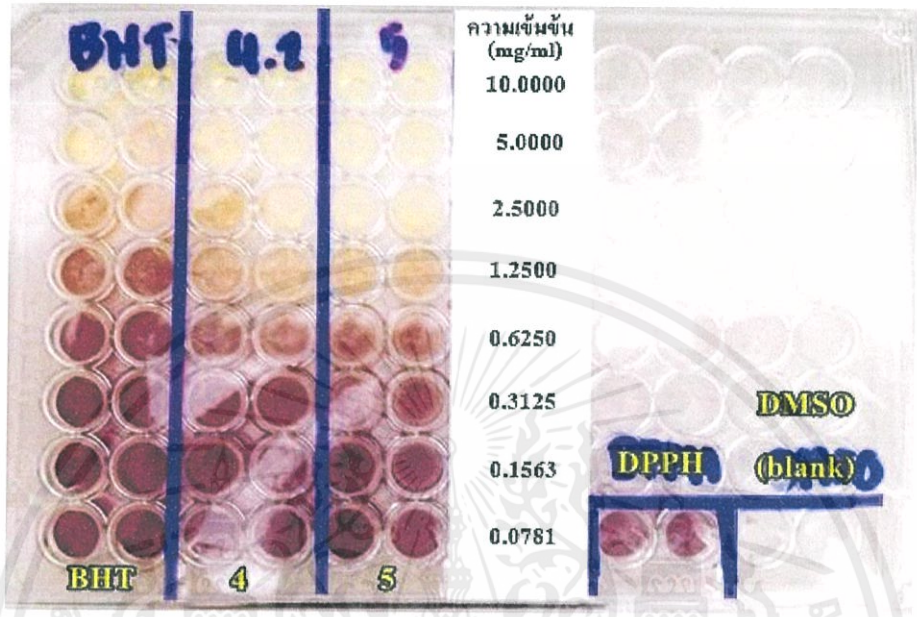
รูปที่ 4.4 TLC ของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_5

4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี DPPH

การทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตโดยการรวมตัวกับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอล พบว่าวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT พบว่าสีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 แสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าสารบริสุทธิ์ส่วนย่อย F_4 และ F_5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย DPPH โดยจะเห็นสีของสารละลาย DPPH จางลงจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลืองอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์ทั้งสองมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี



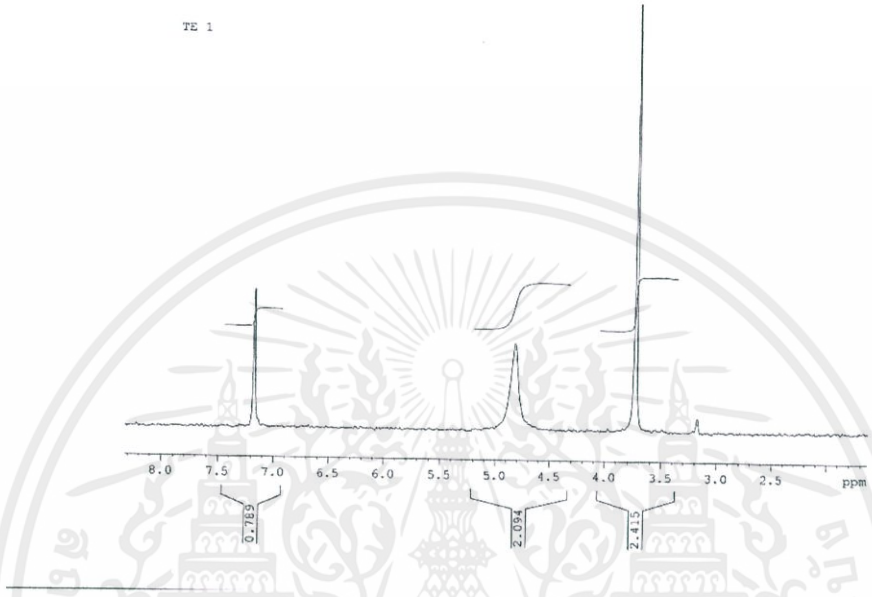
รูปที่ 4.5 สีของสารละลาย DPPH หลังจากทำปฏิกิริยากับสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5

และเมื่อพิจารณาค่า EC_{50} สารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_4 และ F_5 พบว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.6 และ 8.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_4 มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารละลายมาตรฐาน BHT แต่สารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_4 ที่แยกออกมาได้นั้นอาจจะยังไม่ใช่สารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในส่วนย่อย F_4 ซึ่งเห็นได้จากค่า EC_{50} ที่เพิ่มขึ้นจากเดิม 5.8 เป็น 7.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอธิบายได้คือสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพมากกว่านั้นมีขั้วสูงจึงสามารถติดอยู่กับซิลิกาเจลที่มีขั้วสูงได้เหมือนกัน ทำให้สารไม่ถูกชะออกจากคอลัมน์โดยตัวทำละลายได้ และการออกฤทธิ์เสริมกัน (Synergistic phenomenon) ของสารสำคัญในสารสกัดหยาบอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้สารบริสุทธิ์จากส่วนย่อย F_4 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ลดลง

4.8 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 มาวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี โดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) โดยใช้ CD_3OD เป็นตัวทำละลาย ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัม แสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7

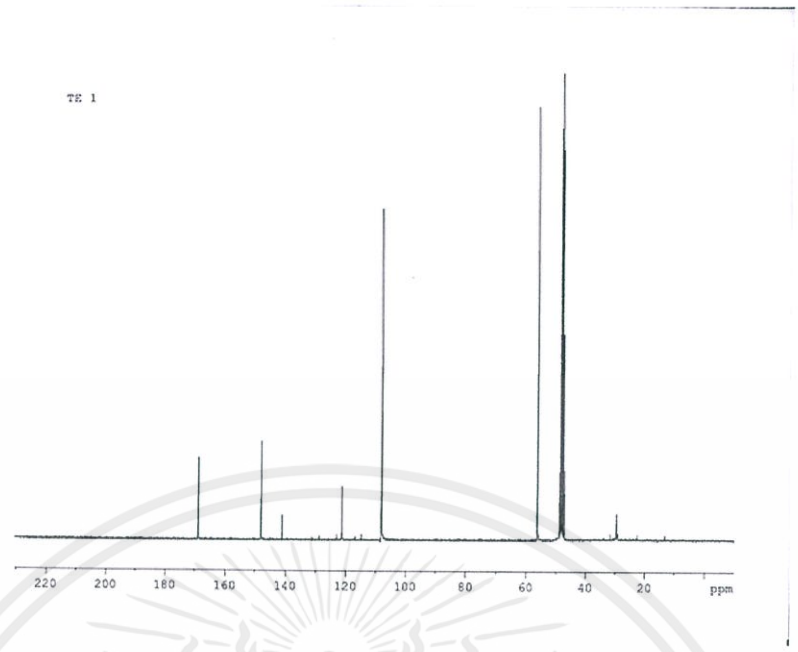


รูปที่ 4.6 ^1H NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งของโปรตอนใน ^1H NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4

ตำแหน่งของโปรตอน	เคมิคัลชิพ (ppm)	ชนิดของโปรตอน
1	3.73	R-O-C<u>H</u>$_3$
2	7.18	Aromatic-H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

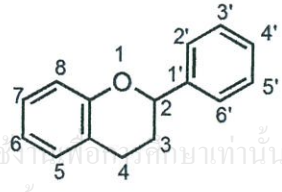


รูปที่ 4.7 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4

ตารางที่ 4.7 ตำแหน่งของคาร์บอนใน ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4

ตำแหน่งของคาร์บอน	^{13}C NMR (ppm)	ชนิดของคาร์บอน
1	56.12	R-O-$\underline{C}H_3$
2	108.11	R-H$\underline{C}$=$\underline{C}$H-R
3	121.28	
4	141.11	Aromatic ring carbons
5	147.97	
6	168.88	

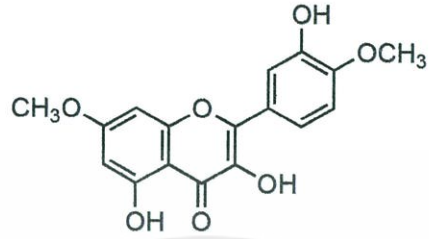
จากข้อมูลของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) สามารถสันนิษฐานโครงสร้างสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 ได้ว่าเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ (flavonoids) **54** มีโครงสร้างหลักคือ



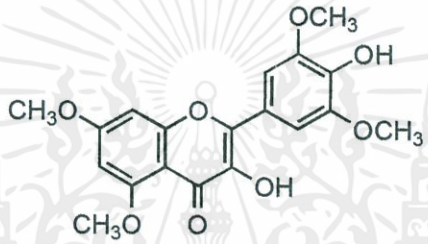
Flavonoids 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

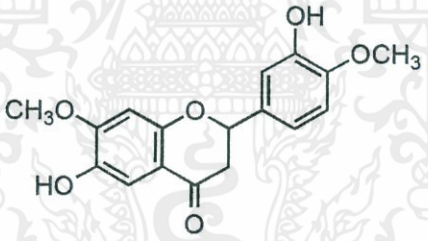
หมู่แทนที่บนวงแหวนแอโรมาติกประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทอกซีที่มีโครงสร้างสมมาตร ดังเช่น 3, 5, 3'-trihydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone **55** , 3, 4'-dihydroxy-5, 7, 3', 5'-tetramethoxyflavone **56** และ 6, 3'-dihydroxy-7, 4,-dimethoxyflavanone **57** แสดงดังรูปที่ 4.8



3, 5, 3'-trihydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone 55



3, 4'-dihydroxy-5, 7, 3', 5'-tetramethoxyflavone 56



6, 3'-dihydroxy-7, 4,-dimethoxyflavanone 57

รูปที่ 4.8 แสดงโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากดอกดาวเรือง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสกัดและแยกสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง โดยนำกลีบดอกดาวเรืองแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสามารถเตรียมสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลได้เท่ากับ 320.9 กรัม และผลได้ร้อยละคิดเป็น 64.18 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักดอกดาวเรืองแห้ง จากนั้นแบ่งสารสกัดหยาบเมทานอล 219.0 กรัม ทำการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ได้สารสกัดหยาบ 4 ชั้นคือสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต และสารสกัดบิวทานอล มีน้ำหนักเท่ากับ 8.13, 1.44 8.86 และ 12.13 กรัม ตามลำดับ และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 3.71, 0.66, 4.04 และ 5.54 ตามลำดับ

5.2 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง

จากการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบดอกดาวเรือง พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 122.388 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีขั้วเนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อยู่ในโครงสร้างจึงเกิดการละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน ดังนั้นเอทิลแอซิเตตจึงเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะสมที่สามารถใช้ในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากดอกดาวเรือง

5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบดอกดาวเรืองด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบเมทานอล สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ DMSO เป็นชุดควบคุม พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตสามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดหยาบอื่น โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ทดสอบได้ทั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นผลมาจากการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัด ทำให้ปริมาณและความหลากหลายของสารต้านออกซิเดชันแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ (ความเป็นขั้ว) ของสารต้านออกซิเดชันนั้น[24] ดังนั้นเอทิลแอซิเตตจึงเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับสารต้านออกซิเดชันมากที่สุด เนื่องจากสามารถละลายสารต้านออกซิเดชันออกมาได้มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นที่ใช้ ซึ่งเห็นได้จากผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

5.4 การแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบชั้นเอทิลแอซิเตต

สามารถแยกสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายคือเฮกเซน: เอทิลแอซิเตต ได้สารส่วนย่อยทั้งหมด 7 ส่วนย่อยคือ F_1, F_2, F_3, F_4, F_5, F_6 และ F_7 พบว่า สารส่วนย่อย F_4-F_6 มีปริมาณมากกว่าสารส่วนย่อย F_1-F_3 และ F_7 คำนวณผลได้ร้อยละของสารส่วนย่อย F_4, F_5 และ F_6 คิดเป็น 13.36, 17.46 และ 60.38 ตามลำดับ

5.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดส่วนย่อย 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 ซึ่งแสดงถึงว่าสารส่วนย่อย F_5 ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด และสารส่วนย่อย F_4 และ F_6 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรองลงมา ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของอัตราส่วนตัวทำละลายระหว่างเอทิลแอซิเตตกับเฮกเซน ทำให้ความเป็นขั้วของตัวทำละลายแตกต่างกัน[24] ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอซิเตตเท่ากับ 25:75 จึงเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับสารต้านออกซิเดชันมากที่มีปะปนอยู่ในสารส่วนย่อย F_5 มากที่สุด จึงสามารถละลายสารต้านออกซิเดชันออกมาได้มากกว่าอัตราส่วนอื่นของตัวทำละลายที่ใช้

5.6 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 และ F_5

นำสารส่วนย่อย F_4 และ F_5 ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 น้ำหนักเท่ากับ 240.0 มิลลิกรัม และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 3.27 และสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_5 น้ำหนักเท่ากับ 405.6 กรัม และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 90.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.7 ผลทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย 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 มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันดีกว่าสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_5 มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.8 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์จากสารส่วนย่อย F_4 โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) โดยใช้ CD_3OD เป็นตัวทำละลาย จากสเปกตรัมของ ^1H NMR พบชนิดของโปรตอนคือเมทอกซีโปรตอน ($R\text{-}OC\underline{H}_3$) และ แอโรมาติกโปรตอน และจากสเปกตรัมของ ^{13}C NMR พบชนิดของคาร์บอน คือเมทอกซีคาร์บอน ($R\text{-}O\underline{C}H_3$) และ แอโรมาติกคาร์บอน สามารถสันนิษฐานได้ว่าสารบริสุทธิ์เป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ที่ประกอบด้วยหมู่เมทอกซีที่มีโครงสร้างสมมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] ณัฐสันต์ วัชรสินธุ์. 2548. การศึกษาศักยภาพทางอัลลีโลพาทีของใบพุทธชาดก้านแดง. โครงงานพิเศษ สาขาเคมีอุตสาหกรรม วิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

[2] J. Rodcharoen, S. Wongsiri and M.S. Mulla. 1997. Biopesticides : Toxicity, Safety, Development and Proper Use. Proceedings First International Symposium on Biopesticides. Chulalongkorn University Press, Bangkok, Thailand.

[3] รัฐตะวัน พูลรมย์, สาวิกา หมานมา และสุภาวิณี สุขโสม. 2553. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของดาวเรือง. โครงงานพิเศษ สาขาเคมีอุตสาหกรรม วิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

[5] รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[6] รัชฎาวรรณ ปัญญา. สารเคมีในพืช. http://www.qsbg.org/article03_48.html

[7] วันดี กฤษณพันธ์. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

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

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

[10] นิจศิริ เรืองรังสี. 2534. พืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

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

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

[13] บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

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

[15] สารสกัดจากดอกดาวเรือง. http://www.vistra.co.th/vistra/know_detail.php?know_id=43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[16] S. Cetkovic, M. Djilas, M. Canadanovic-Brunet and T. Tumbas. 2004. Antioxidant properties of marigold extracts. **Food Research International**, 37, pp. 643-650.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

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

[22] 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.

[23] Y. Li, Z. Qian, B. Ryu, S. Lee, M. Kim and S. Kim. 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia* cava. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, pp. 1963–1973.

[24] A. Ghasemzadeh, H. Z. E. Jaafar and A. Rahmat. 2011. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 5(7), pp. 1147-1154.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้