ผลของช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวพรอพอลิสของชันโรงต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Influence of Harvesting Times on the Total Flavonoid Content and Antiradical Activity of Stingless Bee Propolis

อิมรอน มีชัย[1*] และอิสมะแอ เจ๊ะหลง[2]
Imron Meechai[1*] and Isma-ae Chelong[2]

บทคัดย่อ

พรอพอลิสจากผึ้งชันโรงเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ซึ่งถูกสร้างจากส่วนผสมของยางจากพรรณไม้ตามแหล่งที่อยู่อาศัยของผึ้งชันโรง โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของการเก็บเกี่ยวพรอพอลิสต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ตลอดระยะเวลาหนึ่งปี โดยเก็บตัวอย่างพรอพอลิสจากชันโรงทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ *Geniotrigona thoracica* และ *Heterotrigona itama* จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 2 เดือน จากอำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี นอกจากนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพอลิสของแต่ละสายพันธุ์ จากการศึกษาพบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของ *G. thoracica* และ *H. itama* อยู่ในช่วง 42.33 ถึง 169.67 และ 93.33 ถึง 186.00 มิลลิกรัม เควอซิทินต่อ 100 กรัมสารสกัด ตามลำดับ โดยในช่วงเดือนที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงของสายพันธุ์ *G. thoracica* คือ เดือนธันวาคมถึงมกราคม และเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ส่วนสายพันธุ์ *H. itama* คือ เดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน เดือนธันวาคมถึงมกราคม และเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ซึ่งปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงการเก็บเกี่ยวอาจเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของชนิดพืชพรรณในแต่ละฤดูกาล สำหรับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์กันน้อย ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์หรือต้านฤทธิ์กันกับสารประกอบกลุ่มอื่นของสารสกัดพรอพอลิส อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นเบื้องต้นว่าช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ชีวภาพของพรอพอลิส

คำสำคัญ: พรอพอลิสของชันโรง ผลของช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Propolis from stingless bees is a natural product and has been reported to possess a variety of the biological activities and beneficial chemical constituents. It is constructed from a mixture of rubber from the tree species in the habitat of the beehive and beeswax. The effect of the harvesting time of propolis on its total flavonoid content was measured over a one-year period. The propolis was collected six times (once every 2 months) from two stingless bee species, *Geniotrigona thoracica* and *Heterotrigona itama*, in Sai Buri, Pattani province, Thailand. In addition, the correlation of total flavonoid content with antiradical activities was evaluated. The result showed that the *G. thoracica* and *H. itama* propolis gave total flavonoid content in the range of 42.33-169.67 and 93.33-186.00 mg quercetin equivalent / 100g extract, respectively. A high in flavonoids was determined in *G. thoracica* propolis at harvesting times during the months of December to January and August to September, while the *H. itama* propolis had a high total flavonoid content during the months of October to November, December to January and August to September. The difference of total flavonoid content with respect to harvest times for each species might be related to the plant diversity of each season. There was little association between antioxidant activities and total flavonoid content. This may relate to the synergistic or antagonistic effects of other compounds present in propolis extracts. However, these data indicated that harvesting time had an effect on the chemical constituents and biological activity of stingless bee propolis.

Keywords: stingless bee propolis, harvesting time, total flavonoid contents, antioxidant activities

[1] สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อ. เมือง จ. ยะลา 95000
[2] สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อ. เมือง จ. ยะลา 95000
[1] Chemistry Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Muang, Yala 95000
[2] Biology Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Muang, Yala 95000
*Corresponding author, Email: imron.me@yru.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ผึ้งชันโรงเป็นแมลงที่สามารถผสมเกสรพืชผลทางการเกษตรที่ดีได้หลากหลายชนิด เช่น เงาะ ลิ้นจี่ และสตรอว์เบอร์รี และยังสามารถนำน้ำผึ้งชันโรงซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเลี้ยงมาจำหน่ายเพื่อเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร ปัจจุบันได้มีการเลี้ยงผึ้งชันโรงเพื่อการเกษตรและเชิงพาณิชย์มากขึ้น ซึ่งเป็นการส่งเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรในจังหวัดต่าง ๆ เช่น จังหวัดจันทบุรี สงขลา และพิษณุโลก (อัญชลี สวาสดิ์ธรรม, 2556; Cheurthong et al., 2016) ผลพลอยได้อีกชนิดหนึ่งจากการเลี้ยงผึ้งชันโรง คือพรอพอลิส พรอพอลิสของผึ้งชันโรงถูกสร้างจากยางพรรณไม้หลายชนิด โดยผึ้งชันโรงเก็บเกี่ยวมาผสมกับไขของผึ้ง ซึ่งมีลักษณะเหนียวคล้ายยาง พรอพอลิสจะถูกใช้ในการห่อหุ้มรังและช่วยปกป้องอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม (Vit et al., 2012; Athikomkulchai et al., 2013; Sanpa et al., 2017) พรอพอลิสถูกรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Sanpa et al., 2012; Athikomkulchai et al., 2013; Ibrahim et al., 2016) สำหรับสารสำคัญที่พบส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กลุ่มกรดฟีนอลิก และกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Freitas et al., 2008; Huang et al., 2014) ซึ่งในอดีตพรอพอลิสมีประโยชน์ในการรักษาแผลและฆ่าเชื้อในปาก (Castaldo and Capasso, 2002)

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide: NO) เป็นอนุมูลอิสระในกลุ่ม reactive nitrogen species ที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการทางชีวเคมีของร่างกาย ซึ่งถูกสังเคราะห์จากกรดอะมิโนอาร์จินีนโดยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (Makchuchit et al., 2010; Ng et al., 2015) มีบทบาทหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecule) ในการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาระดับเซลล์ เช่น ทำให้หลอดเลือดมีการขยายตัว ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และยับยั้งการเกาะเม็ดเลือดขาวบนเซลล์บุผนังหลอดเลือด อย่างไรก็ตามหากปริมาณไนตริกออกไซด์ถูกสร้างมากเกินไปอาจก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังต่อเซลล์และนำไปสู่โรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง (รุ่งรัตน์ นิลธเสน, 2559; Ng et al., 2015; Rao et al., 2016) ฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิพบได้ในพืชพรรณธรรมชาติซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอลและยังเป็นสารประกอบที่ถูกรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับโรคต่าง ๆ หลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ และโรคหลอดเลือด (Panche et al., 2016)

ในปี 2018 Zarate et al. (2018) ได้รายงานการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) จากสารสกัดพรอพอลิส โดยตัวอย่างถูกเก็บจาก 11 เขตในเมืองกวานาวาโต (Guanajuato) ประเทศเม็กซิโก ในช่วงเดือนมิถุนายน กรกฎาคม และสิงหาคม พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 13 ถึง 379 มิลลิกรัม เควอซิทินต่อกรัมพรอพอลิส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชซึ่งถูกรายงานในหน่วย trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) อยู่ในช่วง 39.8 ถึง 54.4 TEAC ซึ่งความแตกต่างของพื้นที่มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เนื่องจากแต่ละพื้นที่มีการกระจายพืชพรรณในการเก็บเกี่ยวยางเพื่อผลิตพรอพอลิสที่แตกต่างกัน ในปีเดียวกัน Liben et al. (2018) ได้รายงานการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดพรอพอลิส โดยตัวอย่างถูกเก็บจากตอนเหนือของประเทศเอธิโอเปีย ในเขตพื้นที่ Mekena district ในเดือนมีนาคม โดยลักษณะสีของของตัวอย่างพรอพอลิสแตกต่างกัน ได้แก่ พรอพอลิสสีดำและพรอพอลิสสีดำกลาง พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของพรอพอลิสสีดำจะมีมากกว่าพรอพอลิสสีดำกลาง ซึ่งอาจมีสาเหตุหลักมาจากความแตกต่างของพันธุ์พืช อย่างไรก็ตามจากข้อมูลเบื้องต้นยังไม่มีการรายงานเกี่ยวข้องกับผลของช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของพรอพอลิสของผึ้งชันโรงในช่วงระยะเวลาหนึ่งปี ซึ่งมีรายงานวิจัยเกี่ยวปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งชันโรงในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน โดยพบว่าผึ้งชันโรงแต่ละสายพันธุ์ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายนจะมีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้ค่าที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันตลอดทั้งปี (อิมรอน มีชัย และอิสมะแอ เจ๊ะหลง, 2561)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวพรอพอลิสของผึ้งชันโรงต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมซึ่งเป็นกลุ่มสารที่ถูกรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพบเป็นสารสำคัญในพรอพอลิส นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ซึ่งเป็นวิธีการพื้นฐานในการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกับฤทธิ์ต้านไนตริก-ออกไซด์ซึ่งเป็นกลุ่มอนุมูลอิสระที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์จนเกิดการอับเสบเรื้อรังและเป็นที่มาของโรคอีกหลายชนิด โดยข้อมูลเหล่านี้อาจถูกนำมาใช้พัฒนาและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบ หรืออาจเป็นประโยชน์แก่แพทย์แผนไทยต่อการนำพรอพอลิสมาใช้ประโยชน์ในการผสมกับยาประเภทอื่น นอกจากนี้จะเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรเพื่อเป็นการคัดแยกคุณภาพและเพิ่มมูลค่าของพรอพอลิสแต่ละช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการศึกษา

การเก็บและการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบ

ตัวอย่างพรอพอลิสที่นำมาวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วยสองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ *Geniotrigona thoracica* และ *Heterotrigona itama* ซึ่งถูกเก็บจากฟาร์มเลี้ยงผึ้งชันโรง ตำบลปะเสยะวอ อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บทั้งหมด 6 ช่วงเวลา ในระยะเวลา 1 ปี เริ่มจากเดือนตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2561 ดังใน Table 1

Table 1 Harvesting time of stingless bee propolis during one-year period.

Collection times	During the month-year
1	October 2017 - November 2017
2	December 2017 - January 2018
3	February 2018 - March 2018
4	April 2018 - May 2018
5	June 2018 - July 2018
6	August 2018 - September 2018

การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบโดยนำตัวอย่างพรอพอลิสของชันโรงหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 โดยใช้การสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จนได้สารสกัดหยาบส่วนเอทานอลจากพรอพอลิส โดยสารสกัดทั้งหมดจะถูกเก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการทดสอบ

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทำตามวิธีของ Meda et al. (2005) โดยนำสารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2% w/v อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ในเมทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 437 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ จากนั้นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างจะถูกนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเควอซิทิน (quercetin) ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน (r^2 = 0.995, y = 0.0381x+0.0443) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมรายงานผลในหน่วยของมิลลิกรัมเควอซิทินเทียบเท่าต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ (mg quercetin equivalent (QE)/ 100g extract)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การกำจัดไนตริกออกไซด์

การวิเคราะห์ฤทธิ์การกำจัดไนตริกออกไซด์ดำเนินการตามวิธีของ บุษราคัม สิงห์ชัย และคณะ (2560) โดยผสมสารละลายสารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการเติม Griess reagent (1% sulphanilamide และ 0.1% naphthylenediamine dihydrochlride ใน 3% กรดฟอสฟอริก) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และใช้วิตามินซีและเอทานอลเป็นสารมาตรฐานและชุดควบคุม ตามลำดับ ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน ผลการวิเคราะห์จะถูกรายงานเป็นร้อยละฤทธิ์การต้านไนตริกออกไซด์ (% anti-nitric oxide activity) การคำนวณดังสมการที่ (1)

$$\% \text{ Nitric oxide scavenging} = ((A_0 - A_1)/ A_0) \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนของสารควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl -2-picryl hydrazine (DPPH)

การวิเคราะห์ฤทธิต้านอนุมูลอิสระตามวิธีของ Moreno et al. (2000) ผสมสารละลายสารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ โดยใช้วิตามินซีและเอทานอลเป็นสารมาตรฐานและชุดควบคุม ตามลำดับ ซึ่งถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวกัน ผลการวิเคราะห์จะถูกรายงานเป็นร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (% anti-DPPH activity) การคำนวณดังสมการที่ (1)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม จะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) นำผลที่ได้คิดค่าเฉลี่ยและหาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (standard deviation, SD) ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติวางแผนการทดลองโดยใช้ปัจจัยร่วมกันเป็นแผนแบบแฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด (factorial in CRD) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของผลการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ของผลการทดลองโดยใช้วิธี Pearson product-moment correlation coefficient ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดพรอพอลิสทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงสายพันธุ์ *Geniotrigona thoracica* ในช่วงการเก็บเกี่ยวพรอพอลิสครั้งที่ 1 และครั้งที่ 5 ให้ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่า 200 มิลลิกรัมเควอซิทินเทียบเท่าต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ซึ่งให้ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับช่วงเวลาอื่น ๆ และต่างสายพันธุ์กัน ส่วนสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงสายพันธุ์ *Heterotrigona itama* พบว่า ในช่วงการเก็บเกี่ยวพรอพอลิสครั้งที่ 1 เท่านั้นที่ให้ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่า 200 มิลลิกรัมเควอซิทินเทียบเท่าต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าช่วงการเก็บเกี่ยวครั้งอื่น นอกจากนี้ในช่วงการเก็บเกี่ยวพรอพอลิสครั้งที่ 2 ของสายพันธุ์ *H. itama* ให้ค่าน้อยที่สุด สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงสายพันธุ์ *G. thoracica* และ *H. itama* ของการเก็บเกี่ยวทั้ง 6 ครั้ง อยู่ในช่วง 69.00-244.67 และ 2.68-275.36 มิลลิกรัมเควอซิทินเทียบเท่าต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของสายพันธุ์ไม่มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ($P>0.05$) ดังใน Table 2

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดไนตริกออกไซด์ของสารสกัดพรอพอลิสจากชันโรงสายพันธุ์ *G. thoracica* และ *H. itama* พบว่าการกำจัดไนตริกออกไซด์อยู่ในช่วงร้อยละ 59.13-72.89 และ 40.87-47.99 ตามลำดับ โดยในช่วงการเก็บเกี่ยวครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ให้ร้อยละการกำจัดไนตริกออกไซด์สูงกว่าช่วงอื่นมากกว่าร้อยละ 70 สำหรับสายพันธุ์ *G. thoracica* อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนสายพันธุ์ *H. itama* ให้ค่าร้อยละการกำจัดไนตริกออกไซด์น้อยกว่าร้อยละ 50 ทุกช่วงการเก็บเกี่ยวซึ่งทุกช่วงเวลาของสายพันธุ์ดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงเวลาการเก็บพรอพอลิสไม่มีผลต่อฤทธิ์กำจัดไนตริกออกไซด์ ($P>0.05$) สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพอลิสทั้งสองสายพันธุ์ให้ค่ามากว่าร้อยละ 70 ของทุกช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว โดยที่การเก็บเกี่ยวครั้งที่ 5 และครั้งที่ 6 ของพรอพอลิสจากชันโรงสายพันธุ์ *G. thoracica* ให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าครั้งอื่นอยู่ที่ร้อยละ 86 ส่วนสายพันธุ์ *H. itama* การเก็บเกี่ยวครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าครั้งอื่นอยู่ที่ร้อยละ 90 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดัง Table 2

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดพรอพอลิสของแต่ละสายพันธุ์ในแต่ละครั้งของช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวทั้ง 6 ครั้งให้ค่าที่มากน้อยแตกต่างกัน เนื่องจากยางของพันธุ์ไม้ตามแหล่งที่อยู่อาศัยของผึ้งชันโรงเป็นส่วนผสมหนึ่งในการผลิตพรอพอลิส (Bankova et al., 2000) ดังรายงานวิจัยของ Ishizu et al. (2018) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสจากผึ้งชันโรงสายพันธุ์ *Tetragonula pagdeni* ที่อาศัยในสวนมังคุด พบว่า สารสำคัญของพรอพอลิสมีความคล้ายกันกับยางมังคุด โดยในพื้นที่การเก็บตัวอย่างในการวิจัยครั้งนี้พบพรรณไม้สองชนิด ได้แก่ ต้นชะมวง (*Garcinia cowa*) และมะม่วง (*Mangifera Indica*) อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างพรอพอลิสมีสารสำคัญใกล้เคียงกับพืชพันธุ์ดังกล่าว นอกจากนี้ในแต่ละฤดูกาลพันธุ์ไม้แต่ละชนิดอาจมีการสร้างสารสำคัญมากน้อยแตกต่างกัน และแต่ละสายพันธุ์อาจเลือกยางจากชนิดของพรรณไม้ในการสร้างพรอพอลิสที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดพรอพอลิสของแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน (Salatino et al., 2005) สำหรับการแสดงออกของฤทธิ์ในการกำจัดไนตริกออกไซด์และต้านอนุมูลอิสระของผึ้งชันโรงทั้งสายพันธุ์ *G. thoracica* และ *H. itama* ให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมกับการแสดงออกของฤทธิ์ที่ไม่สอดคล้องกัน โดยค่าความสัมพันธ์ที่ได้เข้าใกล้ศูนย์และติดลบ ยกเว้นของผึ้งชันโรงสายพันธุ์ *G. thoracica* ที่ค่าค่อนข้างเข้าใกล้ 1 ($r = 0.794$) และไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3) แม้ว่าค่าปริมาณฟลาโวนอยด์มากหรือน้อยในแต่ละช่วงการเก็บเกี่ยวก็ตาม จากรายงานวิจัยของ Wang et al. (2016) ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของสารสกัดพรอพอลิสจาก 20 พื้นที่ของประเทศเกาหลีใต้ พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชให้ค่าติดลบ ($r = -0.872$) และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์รวมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชให้ค่าเข้าใกล้ศูนย์ (r = 0.071) ซึ่งเป็นไปได้ว่าผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในครั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณสารสำคัญตัวอื่น ๆ หรือการเสริมฤทธิ์และต้านฤทธิ์กันของสารสำคัญในสารสกัดหยาบพรอพอลิสในแต่ละช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้หากมองในมุมโครงสร้างสารต่อการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Bendary et al., 2013; Meechai et al., 2016) และยังรวมถึงสารสำคัญกลุ่มอื่นที่มีการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น protocatechuic acid, gallic acid และ ellagic acid ซึ่งถูกตรวจพบในพรอพอลิสจากผึ้งชันโรงสายพันธุ์ *Melipona fasciculata* ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรสโครปี (Batista et al., 2016) อาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ดังกล่าวด้วยเช่นกัน

Table 2 Total flavonoid content and antioxidant activities of propolis ethanolic extracts from stingless bee in different collecting times.

Sources of variation	Total flavonoid content (mg QE/ 100g extract)	% Nitric oxide scavenging	% Free radical scavenging
Stingless bee (SB)			
Geniotrigona thoracica (GT)	154.02	67.37^{a}	79.73^{b}
Heterotrigona itama (HI)	111.34	44.77^{b}	85.03^{a}
Collection times (CT)			
Collection times 1 (C1)	238.39^{a}	56.88	83.93^{a}
Collection times 2 (C2)	89.84^{b}	58.45	82.92^{a}
Collection times 3 (C3)	81.83^{b}	52.69	73.78^{b}
Collection times 4 (C4)	112.35^{b}	58.43	87.29^{a}
Collection times 5 (C5)	185.67^{a}	56.55	83.19^{a}
Collection times 6 (C6)	88.00^{b}	53.42	83.20^{a}
Stingless bee x Collection times			
GT x C1	201.42^{c}	72.89^{a}	77.69^{fg}
GT x C2	179.00^{d}	72.26^{a}	74.82^{g}
GT x C3	95.33^{f}	62.63^{bc}	70.26^{h}
GT x C4	136.67^{e}	68.88^{ab}	82.25^{e}
GT x C5	244.67^{b}	68.47^{ab}	86.76^{d}
GT x C6	69.00^{h}	59.13^{c}	86.62^{d}
HI x C1	275.36^{a}	40.87^{d}	90.17^{b}
HI x C2	2.68^{i}	44.64^{d}	91.03^{b}
HI x C3	68.33^{h}	42.75^{d}	77.31^{fg}
HI x C4	88.00^{g}	47.99^{d}	88.68^{c}
HI x C5	126.67^{e}	44.64^{d}	79.62^{ef}
HI x C6	107.00^{f}	47.75^{d}	79.76^{ef}
Vitamin C	-	77.91^{a,1}	94.83^{a,2}
F-Test			
SB	ns	*	*
CT	*	ns	*
SBxCT	*	*	*
CV (%)	52.01	19.20	7.35

Concentration of Vitamin C at 1,000[1] and 0.625[2] µg/ml; Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at P≤0.05 by Duncan's; ns and * = non-significant and significant at P≤0.05, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3 Correlation of total flavonoid content and antioxidant activities of propolis ethanolic extracts from stingless bee

Species	Correlation coefficient	
	Total flavonoid content with % nitric oxide scavenging	Total flavonoid content with % free radical scavenging
Geniotrigona thoracica	0.794 ns	0.156 ns
Heterotrigona itama	-0.498 ns	0.135 ns

"ns" indicates not significant (P>0.05).

สรุปผลการศึกษา

ในการวิจัยครั้งนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าในแต่ละช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวพรอพอลิสของผึ้งชันโรงทั้งสองสายพันธุ์มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวม แต่ส่งผลกระทบน้อยต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ในการกำจัดไนตริกออกไซด์และต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งให้ค่าที่ใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงเวลาของแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการนำพรอพอลิสจากผึ้งชันโรงมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่เกี่ยวข้องหรือมีความสัมพันธ์ต่อกระบวนต้านอนุมูลอิสระอาจสามารถนำมาใช้ได้ตลอดทั้งปี อย่างไรก็ตามควรศึกษฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อเป็นข้อมูลแก่เกษตรกรเพาะเลี้ยงผึ้งชันโรง ผู้ประกอบการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากผึ้งชันโรง และผู้บริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณบำรุงการศึกษาประจำปี 2561 คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา (รหัสโครงการ ควท.บกศ.05/2561) รวมทั้งขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมีและคณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่อำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่วิจัยและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

รุ่งรัตน์ นิลธเสน. 2559. ไนตริกออกไซด์กับโรคหลอดเลือดตีบแข็ง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ* 21(1): 71-79.

บุษราคัม สิงห์ชัย, จันทร์จิรา ขอจุลชัวน และปาริฉัตร ด้วงทอง. 2560. พฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของชาเล็บรอก. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 25(5): 830-838.

อัญชลี สวาสดิ์ธรรม. 2556. *มหัศจรรย์ชันโรง*. กรุงเทพฯ: ทริปเพิ้ล กรุ๊ป.

อิมรอน มีชัย และอิสมะแอ เจ๊ะหลง. 2561. ปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำผึ้งชันโรงในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.ธัญบุรี* 8(2):65-72.

Athikomkulchai, S., Awale, S., Ruangrungsi, N., Ruchirawat, S., and Kadota, S. 2013. Chemical constituents of Thai propolis. *Fitoterapia* 88: 96-100.

Bankova, V. S., De Castro, S. L., and Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31(1): 3-15.

Batista, M. C. A., Abreu, B. V. B., Dutra, R. P., Cunha, M. S., Amaral, F. M. M., Torres, L. M. B., and Ribeiro, M. N. S. 2016. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. *Acta Amazonica* 46(3): 315-22.

Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., and El Hady, S. 2013. Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences* 58(2): 173-181.

Castaldo, S., and Capasso, F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73(Suppl.1): S1-S6.

Cheurthong, P., Naksing, R., and Jongjitvimol, T. 2016. Niche of stingless bee, *Tetragonilla collina* in Wat Jadee Yod Duan, Phitsanulok province. *PSRU Journal of Science and Technology* 1(2): 34-44.

Freitas, M. O., Ponte, F. A. F., Lima, M. A. S., and Silveira, E. R. 2008. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 19(3): 532-35.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., and Hu, F. L. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19(12): 19610-19632.

Ibrahim, N., Mohd Niza, N. F. S., Mohd Rodi, M. M., Zakaria, A. J., Ismail, Z., and Mohd, K. S. 2016. Chemical and biological analyses of Malaysia stingless bee propolis extracts. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 20(2): 413-422.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ishizu, E., Honda, S., Vongsak, B., and Kumazaw, S. 2018. Identification of plant origin of propolis from Thailand stingless. *Natural Product Communications* 13(8): 973-975.

Liben, T., Atlabachew, M., and Abebe, A. 2018. Total phenolic, flavonoids and some selected metal content in honey and propolis samples from South Wolo zone, Amhara region, Ethiopia. *Cogent Food & Agriculture* 4: 1-12.

Makchuchit, S., Itharat, A., and Tewtrakul, S. 2010. Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of Thai medicinal plants. *The Journal of Medical Association of Thailand* 93(suppl.7): s227-s235.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., and Nacoulma, O. G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 91(3): 571-577.

Meechai, I., Phupong, W., Chunglok, W., and Meepowpan, P. 2016. Anti-radical activities of xanthones and flavonoids from *Garcinia schomburgkiana*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8(9): 235-238.

Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R., and Vattuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 71(1-2):109-114.

Ng, R. F. L., Abidin, N. Z., Shuib, A. S., and Ali, D. A. I. 2015. Inhibition of nitric oxide production by *Solanum melongena* and *Solanum macrocarpon* on RAW 264.7 cells. *Frontiers in Life Science* 8(3): 241-248.

Panche, A. N., Diwan, A. D., and Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 5(e47): 1-15.

Rao, U. S. M., Ahmad, B. A., and Moh, K. S. 2016. In vitro nitric oxide scavenging and anti-inflammatory activity of different solvent extract of various parts of *Musa paradisiaca*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 20(5): 1191-1202.

Salatino, A., Teixeira, É. W., Negri, G., and Message, D. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2(1): 33-38.

Sanpa, S., Popova, M., Tunkasiri, T., Eitssayeam, S., Bankova, V., and Chantawannakul, V. 2017. Chemical profiles and antimicrobial activities of Thai propolis collected from *Apis mellifera*. *Chiang Mai Journal of Science* 44(2): 438-448.

Sanpa, S., Sutjarittangtham, K., Tunkasiri, T., Eitssayeam, S., and Chantawannaku, P. 2012. Ultrasonic extraction of Thai propolis for antimicrobial and antioxidant properties. *Advanced Materials Research* 506: 371-374.

Vit, P., Pedro, S. R. M., and Roubik, D. W. 2012. *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. New York: Springer.

Wang, X., Sankarapandian, K., Cheng, Y., Woo, S. O., Kwon, H. W., Perumalsamy, H., and Ahn, Y. J. 2016. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16(65): 1-12.

Zarate, M. S. H., Juárez, M. R. A., García, A. C., López, C. O., Chávez, A. J. G., Garfia, J. J. N. S., and Ramos, F. A. 2018. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Journal of Food Science and Technology* 38(2): 210-215.

วันรับบทความ (Received date) : 3 ก.ค. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 21 ต.ค. 62

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 29 ม.ค. 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้