การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

Phytochemical Constituent and Antioxidant Activity of Aqueous Extract from the Petals of *Nelumbo Nucifera* Gaertn.

ชุลีกานต์ สายเนตร[1] ประสิทธิ์ มุกดา[2]

[1]อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
อีเมล: tnakeeluch.s@gmail.com
[2]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
อีเมล: pramukda@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากดอกบัวสัตตบงกชที่ทำการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล พบสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์และแทนนินแต่ไม่พบแอนทราควิโนน ซาโปนิน และแอลคาลอยด์ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี DPPH assay และ Folin-Ciocaltue ตามลำดับ พบว่าสารสกัดน้ำและเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยรายงานเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 1,543.36 ppm 732.84 ppm ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดน้ำมีค่าเท่ากับ 11.58 mg GAE/g crude extract ในขณะที่สารสกัดเอทานอลมีค่าเท่ากับ และ 17.10 mg GAE/g crude extractสารแอนโทไซยานินในสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 0.124 และ 0.416 ตามลำดับ จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าสารสกัดเอทานอลจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมและมีความเข้มข้นของสารแอนโทไซยานินสูงกว่าสารสกัดน้ำ

คำสำคัญ: อนุมูลอิสระ ดอกบัวสัตตบงกช สารพฤกษเคมี ดีพีพีเอช โฟลิน-ซิโอแคลทู

ABSTRACT

Phytochemical constituent of the aqueous and ethanolic extract from the petals of *Nelumbo Nucifera* Gaertn. revealed the present of bioactive substances such as flavonoids tannin and terpenoids. The anthraquinones, saponins and alkaloids were also tested but not found. The antioxidant activity and total phenolic content were evaluated according to DPPH assay and Folin-Ciocaltue method, respectively. The result showed that aqueous and ethanolic extract had antioxidant activities calculated in IC_{50} 1,543.36 ppm 732.84 ppm, respectively. The total phenolics content of the aqueous extract was 11.58 mg GAE/g crude extract ethanolic extract whereas the ethanolic extract was 17.10 mg GAE/g crude extract. The absorbance of anthocyanin at 530 nm. The aqueous and ethanolic extract was 0.124 and 0.416, respectively. It can be concluded that ethanolic extract was antioxidant activity and total phenolic and concentration of anthocyanin has higher than aqueous extract.

Keywords: Free Radical, *Nelumbo Nucifera* Gaertn., Phytochemical, DPPH, Folin-Ciocaltue

1. บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ใส่ใจด้านสุขภาพมากขึ้นโดยเฉพาะการบริโภคสมุนไพรเนื่องจาก มีความเชื่อกันว่า “สมุนไพร” มีสรรพคุณทางยาและมีคุณค่าทางโภชนาการ ที่สำคัญคือไม่ทำลายสุขภาพ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสมุนไพรได้แก่ ยารักษาโรคชนิดต่างๆ อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ น้ำมันหอมระเหย เครื่องสำอาง และชาสมุนไพร(ปาริสุทธิ์, 2550) นอกจากนี้สมุนไพรยังเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) นานาชนิด ที่มีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยา เช่น แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์(anthroquinone glycoside) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย(Sakulpanichand Grissanapan, 2008) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Beer et al., 2002; Pourmorad et al., 2006) ต้านการอักเสบ (Sharma et al., 2011) และเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย (Ghasemzadeh et al., 2010) แอลคาลอยด์ (alkaloids) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านมะเร็ง (พิสมัย, 2548) ซึ่งพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกนำมาบริโภคเป็นจำนวนมาก บางชนิดผ่านกระบวนการวิเคราะห์หรือทดสอบทางด้านเภสัชวิทยาก่อนนำมาบริโภค

อย่างถูกต้องแต่ยังมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการวิเคราะห์หรือทดสอบทางด้านเภสัชวิทยา ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภคได้

บัวหลวงสัตตบงกช (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) มีชื่อสามัญว่า East Indian Lotus จัดเป็นดอกบัวหลวงสีชมพูที่มีขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว ประกอบด้วยกลีบเลี้ยงขนาดเล็กเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น ส่วนกลีบดอกสีชมพู โคนสีเหลืองอ่อน เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นประมาณ 3 ชั้น ล้อมรอบฐานรองดอก เส้นกลีบดอกเห็นเด่นชัด (วิเชษฐ, 2545) ดังรูปที่1.1 มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชีย ได้แก่ ประเทศไทย จีน และอินเดีย เป็นต้น บัวหลวงสัตตบงกชเป็นไม้ล้มลุกที่มีลำต้นใต้ดินเรียกว่า เหง้า และไหล ที่มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยา ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ได้แทบทุกส่วนเช่นเมล็ดบัวจะช่วยในการบำรุงรักษาเส้นประสาทและไต แก้อาการท้องร่วง ดีบัวสีเขียวเข้มใช้เป็นส่วนผสมของยาแผนโบราณ มีฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อของหัวใจ เกสรตัวผู้ใช้เป็นส่วนผสมของยาหลายชนิด เช่น ยาลม ยาหอม หรือยานัตถุ์ ก้านใบและก้านดอกนำมาทำยารักษาอาการท้องร่วง ราก หรือเหง้านำมาต้มน้ำดื่มแก้ร้อนใน กระหายน้ำ และดอกบำรุงโลหิต (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2547; วุฒิ, 2547)

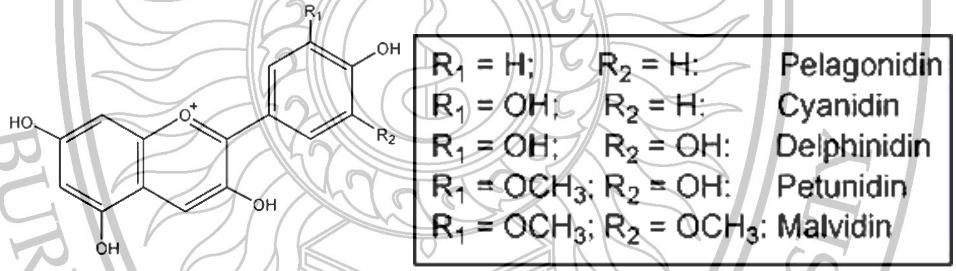
รูปที่ 1.1 ดอกบัวหลวงสัตตบงกช

(ที่มา:www.medthai.com/บัวหลวง/3ธันวาคม 2555)

(สืบค้นเมื่อวันที่:13 กันยายน 2559)

ส่วนของกลีบดอกบัวหลวง (lotus petal)ใช้ทำเป็นยาแก้โรคหนองใน ยาแก้โรคท้องร่วง ยาแก้ไข้ ยาบำรุงหัวใจ และคลอดลูกอ่อน ยาสมานแผล ทำเครื่องสำอางและใช้มวนบุหรี่แทนใบตองและเมี่ยงบัวหลวง

แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)เป็นรงควัตถุ(pigment)ที่มีสีม่วงแดงหรือสีน้ำเงิน ซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์(flavonoid)โดยปัจจุบันแอนโทไซยานินในธรรมชาติมีมากกว่า 15 ชนิดมีชื่อแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl, -OH) และหมู่เมทอกซิล (mathoxyl, -OMe) ที่เข้ามาเกาะกับโครงสร้างของแอนโทไซยานิน (Banerjee et al., 2005) ดังรูปที่ 1.2 ซึ่งแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคมะเร็งเป็นสารต้านโรคภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ใช้ทำสีผสมอาหารในอุตสาหกรรมต่างๆซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติ และช่วยให้เส้นเลือดฝอยแข็งแรงขึ้นและรักษาเส้นเลือดฝอยที่ถูกทำลายเป็นต้น (สุวิชา,2550) และแอนโทไซยานินยังมีสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรจะมีความสัมพันธ์กับสีแดงที่เกิดจากเม็ดสีแอนโทไซยานิน (Sim et al., 1984) และเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณของสารแอนโทไซยานิน (Watada et al.,1975) นอกจากนี้แอนโทไซยานินยังสามารถละลายน้ำได้หรือตัวทำละลายที่มีขั้ว แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว (non-hydroxyl solvent) เช่นอีเทอร์อะซีโตนคลอโรฟอร์มและเบนซีนเป็นต้น (เรือนเงิน, 2544)



รูปที่ 1.2 ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทอกซิลในโครงสร้างของแอนโทไซยานิน

(ที่มา:http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/anthocyanidin.jpg) (สืบค้นเมื่อวันที่:13 กันยายน 2559)

อนุมูลอิสระ(Free Radical) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว(Unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุลพบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อมในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์หรือจากกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของธาตุออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็น

อนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ดีและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อทำให้โมเลกุลของตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียรซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \quad \text{(สมการ 1)}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \quad \text{(สมการ 2)}$$

นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิตเช่นลิพิด(lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน (collagen) ไมโทคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์และก่อให้เกิดโรคต่างๆได้แก่โรคชรา (aging)โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronaryheart disease)โรคความจำเสื่อม (Alzheimer'sdisease) โรคไขข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้(allergies) โรคความดันโลหิตโรคเหงือกโรคเกี่ยวกับสายตาความผิดปกติของปอดและระบบประสาทโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจโรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนังและโรคลำไส้อักเสบเป็นต้น (Ameset al., 1993) สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับอนุมูลอิสระได้โดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไปได้ เป็นสารที่สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายได้เช่นโปรตีน เอนไซม์ และดีเอ็นเอ ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่ให้เข้าไปทำลายองค์ประกอบของเซลล์ (ดังสมการ 3 และ 4)

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \quad \text{(สมการ 3)}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \quad \text{(สมการ 4)}$$

โดย $R^{\bullet}$ และ $RO^{\bullet}$ คืออนุมูลอิสระและ AH คือสารต้านอนุมูลอิสระ (เจนจิราและคณะ, 2554) สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compound)

สารต้านอนุมูลอิสระมีจำนวนมากทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น และที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น ในพืช โดยทั่วไปจะพบสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ โคเอนไซม์ คิวเทน (Coenzyme Q10) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น วิตามินซี (Ascorbic acid)วิตามินอี (α-Tocopherol)และกลูตาไธโอน (Gluthatione)เป็นต้น (R.E.Beyer,1992) พืชที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมักจะมีสารประกอบหลัก คือ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน ซึ่งพบทั่วไปในใบ ลำต้นและเปลือกของพืช (สมหมาย, 2551)

“ดอกบัวหลวง” หรือ “สัตตบงกช” เป็นพืชน้ำที่สามารถหาได้ง่าย คนส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์ในด้านการสักการบูชาสิ่งศักดิ์สิทธิ์หลังจากนั้นก็ทิ้งเกลื่อนกลาดอย่างไร้ค่า ซึ่งภูมิปัญญาของคนไทยแต่ดั้งเดิมในสมัยก่อนนิยมบริโภคกลีบดอกบัวหลวงเป็นอาหาร“เมี่ยงบัวหลวง” ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชที่มีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ตัวทำละลายที่มีพิษน้อย(น้ำและเอทานอล) เพื่อเป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมและสืบสานวัฒนธรรมภูมิปัญญาด้านอาหารไทยที่มีประโยชน์ให้คงอยู่สืบไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชที่ใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด

2.2 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอกลิกรวมของสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชที่ใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด

2.3 เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่อยู่ในสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชที่ใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด

2.4เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารแอนโทซัยยานินที่อยู่ในสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชที่ใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การสกัดดอกบัวสัตตบงกช

นำดอกบัวสัตตบงกชแห้งมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วจึงนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอน แบ่งออกเป็น 2 ส่วนให้มีน้ำหนักเท่ากัน ห่อด้วยผ้าขาวบางเพื่อแช่ในตัวทำละลายเอทานอล

และน้ำปริมาตรอย่างละ 2 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบเทียบกับน้ำหนักของดอกบัวสัตตบงกชแห้ง

3.2 การศึกษาสารประกอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

3.2.1 การตรวจสอบแอนทราควิโนน

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% $H_2SO_4$10 มิลลิลิตรนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาทีกรองแล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) 2- 3 หยด สังเกตสีชมพูแดงที่เกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

3.2.2 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์

ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์ครั้งละ 3-5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมไดคลอโรมีเทน2 มิลลิลิตร เขย่าแล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

3.2.3 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 50% 3 มิลลิลิตร ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้นนำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc.HCl) ให้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3.2.4 การตรวจสอบซาโปนิน

ใช้การทดสอบฟองโดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด กรอง นำของเหลวผลกรอง (filtrate) มาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้นแสดงว่าพบซาโปนิน

3.2.5 การตรวจสอบแทนนิน

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ กรอง หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 2-3 หยดลงไปในของเหลวผลกรอง หากปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

3.2.6 การตรวจสอบแอลคาลอยด์

ชั่งสารสกัด0.2กรัมละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก15ml(2%H_2SO_4) นำไปอุ่น 2-3 นาที กรองน้ำของเหลวผลกรองไปหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ(Dragendorff's reagent) ปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายโทรล็อกซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 30 40 50 60 และ 70 ppm ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชาเพื่อผสมให้ เข้ากัน นำไปตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณหาค่า %Radical scavenging จากสูตร

$$\%\text{Radical scavenging} = \left[1 - \frac{A_{sample}}{A_{control}}\right] \times 100$$

โดยกำหนดให้ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของพืชตัวอย่าง

นำค่า % Radical scavenging ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ที่ 50% (IC_{50})

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกบัวสัตตบงกช

เตรียมสารละลายสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 1,200 1,400 1,600 1,800และ 2,000 ppm ส่วนสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายจะเตรียมที่ความเข้มข้น 400 600 800 1,000 และ 1,200 ppm จากนั้นปิเปตสารละลายพืชตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 2 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชาผสมให้เข้ากัน นำไปตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณหาค่า %Radical scavenging แล้วสร้างกราฟ

มาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ที่ 50% (IC_{50})

3.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

3.3.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น10 20 30 40และ 50 ppm โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ความเข้มข้น 10%(v/v) และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบ 3 นาที นำมาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในที่มืดต่อเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 765นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับมิลลิกรัมของกรดแกลลิก

3.3.3.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดดอกบัวสัตตบงกช

เตรียมสารละลายสกัดดอกบัวสัตตบงกช ที่ความเข้มข้น 300 ppm โดยใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายปิเปตสารละลายสกัดดอกบัวสัตตบงกช ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบ 3 นาที นำมาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (ค่าการดูดกลืนแสงของพืชตัวอย่างจะต้องอยู่ในช่วงกราฟของสารละลายมาตรฐานแกลลิก) และรายงานผลในหน่วย mg GAE/g of extract

3.3.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารแอนโทไซยานิน

นำสารสกัดน้ำและเอทานอลที่เตรียมได้ 1200 ppm มาวัดค่าหาค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

4. ผลการวิจัย

ผลการวิจัยสามารถสรุปตามวัตถุประสงค์ได้ดังนี้

4.1 ผลของปริมาณสารสกัดดอกบัวสัตตบงกช

สารสกัดดอกบัวสัตตบงกชมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีม่วงแดงน้ำหนักของ สารสกัดน้ำและเอทานอลมีค่าเท่ากับ 5.98 และ7.66 g ตามลำดับและร้อยละของผลผลิตที่ได้คิดเป็น 5.98 และ 3.84 ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักของสารสกัดและร้อยละของผลผลิตที่ได้ (percentage yield)

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดดอกบัวสัตตบงกช	**น้ำหนักของสารสกัด (g)**	**ร้อยละของผลผลิตที่ได้**
น้ำ	5.98	5.98
เอทานอล	7.66	7.66

4.2 ผลการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นพบสารพฤกษเคมี 2 ชนิดคือฟลาโวนอยด์และแทนนินทั้งในสารสกัดน้ำและเอทานอล ส่วนเทอร์พีนอยด์จะพบในสารสกัดเฉพาะเอทานอลเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดน้ำและเอทานอล

ชนิดของสารพฤกษเคมี	**วิธีที่ใช้ทดสอบ**	**ชนิดของตัวทำละลาย**	**ผลการทดลอง**
แอนทราควิโนน	Brontranger reaction	น้ำ	**ไม่พบ**เนื่องจากเมื่อเติมสารละลายแอมโมเนียลงไปสีของสารละลายไม่เป็นสีชมพูแดง
		เอทานอล	**ไม่พบ** เนื่องจากเมื่อเติมสารละลายแอมโมเนียลงไปสีของสารละลายไม่เป็นสีชมพูแดง
เทอร์พีนอยด์	Salkowski test	น้ำ	**ไม่พบ** เนื่องจากเมื่อเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปไม่เกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลาย
		เอทานอล	**พบ** เนื่องจากเมื่อเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลาย
ฟลาโวนอยด์	Shinoda test	น้ำ	**พบ** เนื่องจากเมื่อหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไปสารละลายจะมีสีแดง

		เอทานอล	**พบ** เนื่องจากเมื่อหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไปสารละลายจะมีสีแดง
ซาโปนิน	stable foam	น้ำ	**ไม่พบ** เนื่องจากเมื่อทำการเขย่าอย่างแรงไม่มีฟองเกิดขึ้น
		เอทานอล	**ไม่พบ**เนื่องจากเมื่อทำการเขย่าอย่างแรงไม่มีฟองเกิดขึ้น
แทนนิน	ferric chloride test	น้ำ	**พบ** เนื่องจากเมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ลงไปสารละลายจะมีสีเขียวดำ
		เอทานอล	**พบ** เนื่องจากเมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ลงไปสารละลายจะมีสีเขียวดำ
แอลคาลอยด์	Dragendorff's reagent	น้ำ	**ไม่พบ**เนื่องจากหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟลงไปสารละลายจะไม่ตกตะกอนสีส้มแดง
		เอทานอล	**ไม่พบ**เนื่องจากหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟลงไปสารละลายจะไม่ตกตะกอนสีส้มแดง

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay รายงานเป็นค่า IC_{50}ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารต้านต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 50 พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลมีค่า IC_{50}เท่ากับ1,543.36 และ 732.84 ppm ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 3 ในขณะที่สารมาตรฐานโทรลอกซ์มีค่า IC_{50}เท่ากับ 55.77 ppm

ตารางที่ 3 ค่า IC_{50}ของสารสกัดจากกลีบดอกบัวหลวงปทุมชาติ

ชนิดของตัวทำละลาย ที่ใช้ในการสกัดดอกบัวสัตตบงกช	**ค่า IC_{50} (ppm)**
น้ำ	1,543.36
เอทานอล	732.84

4.4 ผลของการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.0105x + 0.0904$, $R^2 = 0.9979$) รายงานเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมสารสกัดพบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 11.58 และ 17.10 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก /กรัมสารสกัด ตามลำดับ (mg GAE/g crude extract) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ชนิดของตัวทำละลาย ที่ใช้ในการสกัดดอกบัวสัตตบงกช	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g crude extract)
น้ำ	11.58
เอทานอล	17.10

4.5 ผลของการหาแอนโทไซยานิน

การหาแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอล ที่มีความเข้มข้น 1,200 ppm ด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 nm พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอล มีค่าเท่ากับ 0.124 และ 0.416 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับแอนโทไซยานิน

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm

ชนิดของตัวทำละลาย ที่ใช้ในการสกัดดอกบัวสัตตบงกช	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 530 nm
น้ำ	0.124
เอทานอล	0.416

5. อภิปรายผล

จากผลการทดลองสามารถนำผลนั้นมาอภิปรายตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยได้ดังต่อไปนี้

(5.1) ผลของปริมาณสารสกัดดอกบัวสัตตบงกช

จากผลการทดลองข้อที่ 4.1 พบว่าปริมาณสารสกัดหยาบดอกบัวสัตตบงกชที่ใช้ ตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณที่สูงกว่าตัวทำละลายน้ำเนื่องจากสารพฤกษเคมีส่วนใหญ่มีขั้วใกล้เคียงกับเอทานอลจึงสามารถละลายได้ดีแต่ตัวทำละลายน้ำสามารถละลายสารพฤกษเคมีที่มีขั้วสูงเท่านั้น ส่วนสารชนิดอื่นๆที่มีขั้วต่ำลงมาจะไม่สามารถทำการละลายได้จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าสารพฤกษเคมีชนิดใดบ้างที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

(5.2) ผลของการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

จากผลการทดลองข้อที่ 4.2 และจากตารางที่ 2 พบว่าสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชโดยใช้ตัวทำละลายน้ำและเอทานอลคือ ฟลาโวนอยด์และแทนนินส่วน

เทอร์พีนอยด์จะพบได้ในสารสกัดเอทานอลเท่านั้น เนื่องจากโครงสร้างของเทอร์พีนอยด์มีอะตอมของธาตุคาร์บอนจำนวนมากจึงไม่ละลายในน้ำแต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทานอล

(5.3) ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารฟีนอลิกรวม

จากผลการทดลองข้อที่ 4.3-4.4 และจากตารางที่ 3-4 พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำและเอทานอลเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์มีค่าเท่ากับ 1,543.36 ppm และ 732.84 ppm ตามลำดับ จึงทำให้ทราบว่าสารสกัดเอทานอลมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าน้ำ ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารสกัด ส่วนปริมาณของปริมาณของสารฟีนอลิกรวมโดยพิจารณาจากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกพบว่าในสารสกัดเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pourmorad et al. (2006) ที่พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงด้วย

(5.4) ผลของปริมาณสารแอนโทไซยานิน

จากผลการทดลองข้อที่ 4.5 พบว่าความเข้มข้นของสารแอนโทไซยานินของสารสกัดเอทานอลสูงกว่าสารสกัดน้ำ เนื่องจากมีความมีขั้วใกล้เคียงกัน

6. สรุปผล

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชโดยใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถสรุปได้ว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีกว่าน้ำ เนื่องจากให้ปริมาณของสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชที่สูงซึ่งแปรผันโดยตรงต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาที่ดีกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

7. ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสารสกัดดอกบัวสัตตบงกชพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีสารที่ออกฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาจริง ซึ่งผู้วิจัยจึงเห็นควรอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาต่อยอดและประยุกต์ใช้สารสกัดจากดอกบัวสัตตบงกชในงานด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง สีย้อมผ้าและโดยเฉพาะด้านอาหาร (เนื่องจากใช้ตัวทำละลายในการสกัดมีพิษน้อยมาก)ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M., 1993, **Oxidants, antioxidants, and the degenerativedisease of aging**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922.

Banerjee, A. and N. Dasgupta. 2005. **In vitro study of antioxidant activity of Syzygiumcumini fruit**. Food Chemistry. 90 : 727-733.

Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., and Manley, M. (2002). **Phenolic compounds: A review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine**. South African Journal of Enology and Viticulture.23(2): 48-61.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., and Rahmat, A. (2010). **Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officianle*Roscoe)**. Molecules. 15: 4324-4333.

Sakulpanich, A., and Grissanapan, W. (2008). **Extraction method for high content of anthraquinones from *Cassia fistula* pods**. Journal of Health Research 22(4): 167-172.

Sharma, G.N., Dubey, S.K., Sati, N., and Sanadya, J. (2011). **Anti-inflammatory activity and total phavonoid content of *Aeglemarmelos*seeds**. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 3(3): 214-218.

Sim, C.A. and J.R. Moris. 1948. **Effect of pH, sulfure dioxide, storage time, and temperature on the color and stability of red muscadine grape wine** . Enol. Vitic. 35(1): 35-39.

Slinkard, K., and Singleton, V.L. (1997). **Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods**. American Journal of Enology and Viticulture 28(1): 49-55.

Tan, S.K. Osman, H., Wong, K.C., Boey, P.L., and Ibrahim, P. (2009). **Antimicrobial and antioxidant activities of *Swieteniamacrophylla*leaf extracts**. Asian Journal of Food and Agro-Industry 2(2): 181-188.

Watada, A.E. and J.A. Abbott. 1975. **Objective method of estimating anthocyanin content fordetermining color grade of grapes**. Food Sci. 40: 1278-1279.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารสุข. (2547).**สมุนไทย-จีน**, กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์การศาสนา.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554).**อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ**: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา, ว.วิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ 1(1): 59-70.

พิสมัย เหล่าภัทรเกษม. (2548). **บทบาทของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการป้องกันและรักษามะเร็ง**. ศรีนครินทร์เวชสาร 20(3): 180-189.

ปาริสุทธิ์ สงทิพย์. (2550). **"การพัฒนาอาหารคบเคี้ยวชนิดแท่งจากข้าวกล้องและสมุนไพร"** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย, ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ และคณะ. (2552).**การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด จากบัวหลวง**.วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

เรือนเงิน สินธุ. (2544). **การสกัดและคุณภาพวิเคราะห์ของแอนโธไซยานินส์ในลูกหว้า**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.

สุวิชา ดีหะสิงห์. (2550). **การสกัดและการทำให้สารแอนโทไซยานินในลูกหว้าบริสุทธิ์**. ปัญหาพิเศษสายวิชาวิทยาศาสตร์คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมหมาย ปัตตาลี. (2551).**"การศึกษาคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากผลมะหลอด,"**ปริญญาการศึกษาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคณะ. (2556).**การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ**. ว.วิทย. มข. 41(3) 723-730.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช.(2547). **คัมภีร์เภสัชรัตนโกสินทร์**, กรุงเทพฯ: บริษัทศิลป์สยามบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์จำกัด.

วิเชษฐ ค้าสุวรณ. (2545). **การปลูกบัว.** ไทยวัฒนาพานิชจำกัด, กรุงเทพฯ.

.