นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า

กชกร ทองมาก[1] ธารารัตน์ จันทร์พัฒน์[1] รติมา จันแดง[1]
วิทวัส หมาดอี[1] และกุสุมาลย์ น้อยผา[1*]
[1]สาขาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาการสุขภาพและการกีฬา มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail: kusumarn.n@hotmail.com

Received date: March 23, 2021; Revised date: March 23, 2021; Accepted date: November 23, 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงปริมาณ ในรูปแบบของการวิจัยกึ่งทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า คือ มะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวง 2) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพิกัดเกสรทั้งห้า ทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบเอทานอลจากพิกัดเกสรทั้งห้า ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยมีกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ผลการวิจัยพบว่าสารกลุ่มแอนทราควิโนน อัลคาลอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และคูมารินสามารถพบได้ในสารสกัดหยาบของพืชทั้งห้าชนิด โดยพบว่า สารสกัดหยาบเกสรบัวหลวงและกรดแกลลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.82 µg/mL และ 0.72 µg/mL ตามลำดับ สารสกัดหยาบสารภีมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เฉลี่ย 84.50±0.37 mgGAE.G^{-1}

คำสำคัญ : พิกัดเกสรทั้งห้า, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

Original Article

Preliminary Phytochemical Study and Antioxidant Activity of Five Flowers Remedy

Kodchakorn Thongmak[1] Thararat Janpat[1] Ratima Chandang[1]
Wittawat Marde[1] and Kusumarn Noipha[1*]
[1]Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Health and Sports Science,
Thaksin University, Phatthalung Campus
*Corresponding Author E-mail: kusumarn.n@hotmail.com

Abstract

This research is quantitative study based on quasi-experimental research. The objectives of this study were to 1) study the preliminary phytochemicals of a group of five flowers remedy, namely, *Jasminum sambac, Mimusops elengi, Mesua ferrea, Mammea siamensis* and *Nelumbo nucifera*, 2) to further study the antioxidant activity. Phytochemical determination was studied in ethanol extracts of five flowers remedy. Antioxidant activity was studied by DPPH method and determination of total phenolic content was studied by Folin-Ciocalteu method using gallic acid as standard compound. Alkaloids, cardiac glycosides, tannins, flavonoids, terpenoids, and coumarins were found in all five flowers remedy crude extracts. Flowers extract of *Nelumbo nucifera* and gallic acid were found to have high antioxidant activity at IC_{50} 0.82 µg/mL and 0.72 µg/mL, respectively. Flowers extract of *M. siamensis* gave the highest phenolic content at 84.50±0.37 mgGAE.G^{-1}.

Keywords: group of five flowers remedy, phytochemicals, preliminary phytochemical study

บทนำ

ในร่างกายของมนุษย์ประกอบด้วยอนุมูลอิสระ ซึ่งมีปัจจัยที่เกิดขึ้นจากวิถีชีวิตในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงที่มีผลจากด้านร่างกาย จิตใจ และสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น ทางด้านร่างกาย คือ การไม่ใส่ใจดูแลสุขภาพ ไม่คัดเลือกคุณประโยชน์และคำนึงถึงปริมาณของอาหารที่รับประทานในแต่ละมื้อ นอนหลับพักผ่อนไม่เพียงพอ ไม่แบ่งเวลาสำหรับออกกำลังกาย ทางด้านจิตใจ คือ มีภาวะความเครียดวิตกกังวล ท่ามกลางสภาพแวดล้อมและมลพิษทางสังคม เนื่องจากในสถานการณ์ปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ซึ่งทวีความรุนแรงอย่างต่อเนื่องทำให้เกิดความวิตกกังวลแก่ผู้คนในประเทศ ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของสารอนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์ อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุและทำให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจและโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดริ้วรอยก่อนวัย[1] จากรายงานการศึกษา พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ประเภทโพลีฟีนอล โดยสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลมีสรรพคุณหลายด้าน เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โรคหัวใจและระบบไหลเวียนของโลหิต[2] ซึ่งการได้รับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ สามารถลดความเสี่ยงและความรุนแรงของโรคเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้

คำว่า เกสร หรือที่โบราณใช้เป็น เกษร ในความหมายที่เกี่ยวกับพิกัดยานั้นอาจหมายถึง เกสรเพศผู้ ได้แก่ เกสรบัวหลวง หรือดอกไม้ทั้งดอก (รวมกลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมีย) ได้แก่ ดอกมะลิ เป็นต้น หรืออาจหมายถึงช่อดอกทั้งช่อ ได้แก่ ดอกลำเจียก พิกัดเกสรที่ใช้ในยาไทย มี 3 พิกัด คือ พิกัดเกสรทั้งห้า พิกัดเกสรทั้งเจ็ด และพิกัดเกสรทั้งเก้า ซึ่งพิกัดเกสรทั้งห้า ได้แก่ มะลิ (*Jasminum sambac* Linn., Arabian jasmine) พิกุล (*Mimusops elengi* L., Bullet wood) บุนนาค (*Mesua ferrea* Linn., Iron wood) สารภี (*Mammea siamensis* kosterm) และเกสรบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn., Sacred lotus) มีสรรพคุณชูกำลัง บำรุงหัวใจ แก้ไข้เพื่อเสมหะและโลหิต แก้ลมวิงเวียน แก้น้ำดี แก้ธาตุ ทำให้เจริญอาหาร บำรุงครรภ์ เครื่องยาพิกัดนี้ ใช้มากในยาแก้ลมวิงเวียน และยาหอมบำรุงหัวใจ[3] ในอดีตมีการนำพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้ามาใช้ในการบำบัดโรคภัยไข้เจ็บ โดยนิยมใช้เป็นยาต้ม ซึ่งมีขั้นตอนการปรุงที่ซับซ้อน ส่งผลให้ภูมิปัญญาเหล่านี้เริ่มสูญหายไป เพราะขัดแย้งกับวิถีชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบัน จึงทำการศึกษาวิจัยนี้ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อวิถีชีวิตที่มีการเปลี่ยนแปลงไป ไม่ว่าจะเป็นการใช้ชีวิตที่เร่งรีบหรือการทำงานหนักเกินกำลังจนก่อให้เกิดความวิตกกังวล และผลเสียต่างๆ ต่อร่างกาย พบการวิจัยผลิตภัณฑ์ชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า หรือเรียกว่า สารสกัดน้ำจากพิกัดเกสรทั้งห้า มีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยมีกลไกเสริมฤทธิ์กันในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจเป็นฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพิกัดในการบำรุงร่างกายตามตำราทางการแพทย์แผนไทย[4] อีกทั้งยังทำให้รู้สึกผ่อนคลาย และสามารถลดความเสี่ยงหรือความรุนแรงของโรคเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้ ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ชาชงสมุนไพรจากพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า ได้แก่ มะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสร บัวหลวง

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า

ระเบียบวิธีการศึกษา

1. วัตถุดิบและการสกัด

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า

คัดเลือกพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า ได้แก่ ดอกมะลิ ดอกพิกุล ดอกบุนนาค ดอกสารภี และเกสรบัวหลวง โดยเลือกดอกหรือเกสรที่สมบูรณ์ สดใหม่ และนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ซึ่งทางผู้วิจัยได้ทำการสั่งซื้อพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้า ซึ่งเป็นรูปแบบแห้งจากสมุนไพรอภัยภูเบศรเนื่องจากเป็นแหล่งจำหน่ายสมุนไพรที่มีคุณภาพ และผ่านหลักเกณฑ์มาตรฐานการผลิต GMP

1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากพิกัดเกสรทั้งห้า

เตรียมสารสกัดหยาบโดยการนำพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้าซึ่งเป็นรูปแบบแห้งจากแหล่งจำหน่ายสมุนไพรอภัยภูเบศร และทำการชั่งพิกัดเกสรทั้งห้า ได้แก่ มะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวง หนักสิ่งละ 50 กรัม โดยทำการสกัดด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการหมักแช่ (maceration) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว เมื่อครบกำหนดนำมากรองเอาตะกอนและเศษพืชออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันภายใต้ สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการระเหยแห้งจนกระทั่งตัวทำละลายระเหยหมด นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากพืชแต่ละชนิดไปชั่งน้ำหนัก แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมสำหรับการทดลองต่อไป

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบพิกัดเกสรทั้งห้า

การศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบพิกัดเกสรทั้งห้า โดยทำการศึกษาสารทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ แอนทราควิโนน แอลคาลอยด์ คูมาริน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ ซาโปนิน และเทอร์พีนอยด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี ฟองหรือตะกอน[5] โดยแต่ละขั้นตอนการทดสอบ มีการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ขั้นตอนการศึกษา แอนทราควิโนน โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (10% H_2SO_4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน นำไปอุ่นบน Hotplate 5 นาที แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณภูมิห้อง เติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) 0.5 มิลลิลิตร ทำการเขย่า หากปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้น แสดงว่าพบ แอนทราควิโนน

ขั้นตอนการศึกษา อัลคาลอยด์ โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก (10% H_2SO_4) 15 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน นำไปอุ่นบน Hotplate 5 นาที จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ไปหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) หากปรากฏตะกอนสีส้มแดง แสดงว่าพบ อัลคาลอยด์

ขั้นตอนการศึกษา คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน นำไปอุ่นประมาณ 5 นาที แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) 3 หยด และกรดแอซิติก 5 หยด เขย่าและค่อย ๆ เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

(Conc.H_2SO_4) จากนั้นสังเกตรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับ H_2SO_4 ถ้าพบการเปลี่ยนแปลงเป็นวงแหวน สีน้ำตาล แสดงว่าพบ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ขั้นตอนการศึกษา แทนนิน โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดบน Hotplate 2 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก รอให้เย็นที่อุณภูมิห้อง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) 3 หยด ทำการเขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีหรือตะกอนสีเขียวหรือสีน้ำเงินอ่อนเกิดขึ้น แสดงว่าพบ “Condensed tennins”หรือถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีหรือตะกอนสีน้ำเงินหรือสีดำ แสดงว่าพบ Hydrolysable Tannins

ขั้นตอนการศึกษา ฟลาโวนอยด์ โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติม 50% เอทานอล 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมลวดแมกนีเซียม 1 ชิ้น และนำไปอุ่นบน Hotplate 5 นาที และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc.HCl) 5 หยด สังเกตถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูหรือแดง (ซึ่งสีของสารละลายจะจางหายไปเมื่อทิ้งไว้ 3-5 นาที) เกิดขึ้น แสดงว่าพบ ฟลาโวนอยด์

ขั้นตอนการศึกษา เทอร์พีนอยด์ โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 0.5 มิลลิลิตร สังเกตรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับ H_2SO_4 มีลักษณะเป็นวงแหวนสีน้ำตาลเกิดขึ้น แสดงว่าพบ เทอร์พีนอยด์

ขั้นตอนการศึกษา สเตียรอยด์ โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมกรดอะซิติก (Acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 3 หยด หากสารละลายปรากฏสีน้ำเงินหรือสีเขียว แสดงว่าพบ สเตียรอยด์

ขั้นตอนการศึกษา ซาโปนิน โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน นำไปอุ่นบน Hotplate 5 นาที ทำการเขย่าแรง ๆ ถ้าปรากฏสารละลายเกิดเป็นฟองถาวรเกิดขึ้น แสดงว่าพบ ซาโปนิน

ขั้นตอนการศึกษา คูมาริน โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติม 50% เอทานอล 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเหลืองเข้มเกิดขึ้น แสดงว่าพบ คูมาริน

2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, & Mendez, 2002[6] มีหลักการคือสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) จะเป็นสารละลายสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยผสมสารละลายมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 mL กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 1 mL ให้เข้ากัน บ่มในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณค่าร้อยละการต้าน อนุมูลอิสระจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH radical inhibition} = [\ 1-(A_{simple}/-A_{control})] \times 100$$

เมื่อ A_{simple} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

หากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าร้อยละ 50 ทดสอบหาค่า IC_{50} โดยการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คำนวณค่า IC_{50} จากการเทียบค่าในกราฟ ระหว่างความเข้มข้นและค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สูตรเดียวกัน ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (n=3) และนำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X}$±S.D.)

วิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า

ชั่งผงสมุนไพรพิกัดเกสรทั้งห้าขนาด 2 กรัม บรรจุในซองชา แช่ในน้ำร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 - 4 นาที รอให้น้ำชาเย็นแล้วนำไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH เหมือนการตรวจสอบสารสกัดหยาบจากพืชที่จัดอยู่กลุ่มพิกัดเกสรทั้งห้าเป็นน้ำชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า ปริมาตร 1 mL โดยรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition)

2.3 การศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม โดยวิธี Follin-Ciocaltel

การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Follin-Ciocaltel[7] และอ่านค่าสัญญาณด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยเตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125 และ 62.5 µg/mL ในน้ำกลั่น และเตรียมสารตัวอย่าง บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวงเจือจางที่ความเข้มข้น 1 mg/mL มะลิเจือจางที่ความเข้มข้น 5 mg/mL และพิกุลเจือจางที่ความเข้มข้น 10 mg/mL เตรียมตัวอย่างน้ำชาจากการชงชา บรรจุซองโดยชั่งผงชาตามอัตราส่วน บรรจุซอง ขนาด 5x5 เซนติเมตร ปิดซองด้วยเครื่องซีล ใส่ซองชาลงในบีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร เติมน้ำเดือด 100 มิลลิลิตร และแช่ไว้ประมาณ 3 นาที นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 mL ผสมกับสารละลาย 20% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 1 mL ทำการเขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.35% NaOH) ปริมาตร 2 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร หาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัด โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลายกรดแกลลิกในหน่วย mgGAE.G^{-1}

3. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics)

ค่าสถิติร้อยละ (Percentage)

ค่าเฉลี่ย (Mean) ใช้สูตร (ชูศรี วงศ์รัตนะ, 2541)

เมื่อ $\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ย

ΣX แทน ค่าผลรวมของคะแนนทั้งหมด

n แทน ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

3.2 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) (ล้วน สายยศ และอังคณา, 2540)

$$S.D. = \sqrt{\frac{n\Sigma x^2 - (\Sigma x^2)}{n(n-1)}}$$

เมื่อ S.D. แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Σx^2 แทน ค่าผลรวมของคะแนนแต่ละตัว ยกกำลังสอง

(Σx^2) แทน ค่าผลรวมของคะแนนทั้งหมด ยกกำลังสอง

n แทน ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

ผลการศึกษา

1. น้ำหนักสารสกัดและร้อยละผลผลิตของสารสกัดพิกัดเกสรทั้งห้า

จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากพิกัดเกสรทั้งห้า ได้แก่ มะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวง โดยการแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และเมื่อนำไประเหยแห้ง จะได้เป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract) ของพิกัดเกสรทั้งห้า โดยสารสกัดดังกล่าวมีน้ำหนักสารสกัดและร้อยละผลผลิต เท่ากับ มะลิ 1.67 กรัม (ร้อยละ 3.34) พิกุล 2.62 กรัม (ร้อยละ 5.24) บุนนาค 2.58 กรัม (ร้อยละ 5.16) สารภี 7.04 กรัม (ร้อยละ 14.08) และเกสรบัวหลวง 5.97 กรัม (ร้อยละ 11.84)

2. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

จากผลการศึกษาในตารางที่ 1 ตรวจพบสารพฤกษเคมี ได้แก่สารกลุ่มแอนทราควิโนน อัลคาลอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และคูมาริน ในสารสกัดหยาบของมะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวง สามารถตรวจพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ ในสารสกัดหยาบของมะลิ และพิกุล และสามารถตรวจพบสารกลุ่มซาโปนิน ในสารสกัดหยาบของสารภี และเกสรบัวหลวง

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

จากผลการศึกษาในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด 4 อันดับแรกโดยเรียงลำดับ คือ สารสกัดหยาบของเกสรบัวหลง บุนนาค สารภี และมะลิ ตามลำดับ โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับดีมาก โดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 65 µg/mL ตามเกณฑ์ของ Joabe และคณะ (2010)[8] (ถ้าค่า IC_{50} ต่ำกว่า 65 µg/mL แสดงว่ามีฤทธิ์ดีมากค่า IC_{50} ระหว่าง 65-152 µg/mL มีฤทธิ์ดี ส่วนค่า IC50 มากกว่า 152 µg/mL มีฤทธิ์ต่ำ) และในขณะที่ชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าชาชงบางชนิด โดยชาชงพิกัดเกสรทั้งห้าพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ ร้อยโดยชาชงพิกัดเกสรทั้งห้าพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ ร้อยละ 0.46 ซึ่งใกล้เคียงกับชาชงชนิดหนึ่งในท้องตลาด

4. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

จากผลการศึกษาในตารางที่ 3 พบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดหยาบของเกสรทั้งห้า และชาชงพิกัดเกสรทั้งห้ามีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยพบสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดหยาบของสารภีสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบของเกสรบัวหลวง และสารสกัดหยาบของมะลิ ตามลำดับ และพบสารกลุ่มฟีนอลิกในชาชงพิกัดเกสรทั้งห้ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.38±0.01 $mgGAE.G^{-1}$

อภิปรายผล

ผลการศึกษาการตรวจสอบสารพฤกษเคมีสามารถตรวจพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้จากสารสกัดหยาบของมะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวง ซึ่งฟลาโวนอยด์ถือว่าเป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ หรือ ยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน[9] และสามารถตรวจพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ได้จากสารสกัดหยาบของมะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวง สารอัลคาลอยด์เป็นกลุ่มผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สารเหล่านี้มีผลทางสรีรวิทยาต่อระบบต่างๆ ของสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนม และสารบางชนิดถูกใช้ในกระบวนการรักษาทางการแพทย์ที่สำคัญ เช่น Atropine, Morphine, Quinine และ Vincristine เป็นกลุ่มสารอัลคาลอยด์ที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย และโรคมะเร็ง[10] ซึ่งจากงานวิจัยของ ณพัฐอร บัวฉุน (2562)[11] พบว่า การทดสอบสารพฤกษเคมีจากสารสกัดหยาบของเกสรบัวหลวงพบสารกลุ่มฟาโวนอยด์ แต่ไม่พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด 4 อันดับแรกโดยเรียงลำดับ คือ สารสกัดหยาบของเกสรบัวหลวง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.38 µg/mL สารสกัดหยาบของบุนนาค มีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.38 µg/mL สารสกัดหยาบของสารภี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.14 µg/mL และสารสกัดหยาบของมะลิ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.07 µg/mL ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุธาทิพย์ อินทรกำธรชัย, นฤนันท์ วุฒิสินธุ์ และ ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ (2556)[12] พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบดอกมะลิลามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.87 mg/mL และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 56.05 mgGAE.G^{-1} เนื่องจากการใช้ดอกมะลิ ที่มีแหล่งเพาะปลูก หรือฤดูกาลเก็บเกี่ยวที่ต่างกัน อาจทำให้มีสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันได้ และสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด คือ สารสกัดหยาบจากพิกุล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 55.91 µg/mL โดยเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.72 µg/mL ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาจากวิจัยของ สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ (2558)[13] ที่พบว่าสารสกัดหยาบของเกสรบัวหลวง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบของ มะลิ พิกุล บุนนาค และสารภี สำหรับผลการศึกษาผลิตภัณฑ์ชาชงพิกัดเกสรทั้งห้ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.46 µg/mL มีปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.38±0.01 mgGAE.G^{-1} ซึ่งไม่พบงานวิจัยใดที่มีการนำผลิตภัณฑ์ชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า มาทำการศึกษาทดสอบหาสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ชาชงพิกัดเกสรทั้งห้ามีสรรพคุณที่มีคุณภาพ

บทสรุป

จากการศึกษาสารพฤกษเคมีของพิกัดเกสรทั้งห้าคือ มะลิ พิกุล บุนนาค สารภี และเกสรบัวหลวง พบว่าสามารถตรวจพบสารกลุ่มแอนทราควิโนน อัลคาลอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และคูมาริน สารสกัดหยาบของบุนนาคและชาชงเกสรบัวหลวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด สารสกัดสารภีให้ปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และชาชงพิกัดเกสรทั้งห้าให้ปริมาณฟีนอลิกรวม เฉลี่ย 0.38±0.01 mgGAE.G^{-1}

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาการสุขภาพและการกีฬา มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่สนับสนุนทุนวิจัย และคณะอุตสาหกรรมเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 สารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบพิกัดเกสรทั้งห้าด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล

สารพฤกษเคมี	มะลิ	พิกุล	บุนนาค	สารภี	เกสรบัวหลวง
แอนทราควิโนน	+	+	+	+	+
อัลคาลอยด์	+	+	+	+	+
(Dragendorff's reagent)					
คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	+	+	+	+	+
แทนนิน	++	+	+	++	+
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	++
(Magnesium test)					
เทอร์พีนอยด์	+	+	+	+	+
สเตียรอยด์	+	+	-	-	-
ซาโปนิน	-	-	-	+	+
คูมาริน	+	+	++	++	++

หมายเหตุ ++ พบสารพฤกษเคมีปริมาณมาก, + พบสารพฤกษเคมีปริมาณน้อย, - ไม่พบสารพฤกษเคมี

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลและชาชงพิกัดเกสรทั้งห้าโดยวิธี DPPH

สมุนไพร / สารทดสอบ	สารสกัดหยาบเอทานอล			ชาชง		
	ความเข้มข้น (µg/mL)	%Inhibition ($\bar{X}$±S.D.)	IC_{50} (µg/m)	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	%Inhibition ($\bar{X}$±S.D.)	IC_{50} (ร้อยละ)
มะลิ	12.50	20.46±3.27	37.07	0.32	9.25±2.52	2.45
	25.00	39.00±3.82		0.63	16.01±0.00	
	50.00	63.71±3.28		1.25	35.47±0.82	
	100.00	90.35±0.54		2.50	52.67±1.51	
	200.00	96.91±1.09		5.00	77.22±0.72	
พิกุล	12.50	19.62±0.53	55.91	0.63	17.73±1.94	1.92
	25.00	28.30±2.14		1.25	35.80±0.74	
	50.00	63.02±2.14		2.50	63.34±0.74	
	100.00	80.75±0.53		5.00	87.61±0.00	
	200.00	87.55±0.53		10.00	92.08±0.00	
บุนนาค	12.50	45.39±1.05	14.38	0.06	13.19±0.35	0.48
	25.00	77.12±0.00		0.13	15.94±0.34	
	50.00	85.24±0.00		0.25	31.07±0.23	
	100.00	88.56±0.52		0.50	51.13±0.00	
	200.00	93.36±1.05		1.00	79.61±0.69	

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลและชาชงพิกัดเกสรทั้งห้าโดยวิธี DPPH (ต่อ)

สมุนไพร / สารทดสอบ	สารสกัดหยาบเอทานอล			ชาชง		
	ความเข้มข้น (µg/mL)	%Inhibition (X̄±S.D.)	IC_{50} (µg/m)	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	%Inhibition (X̄±S.D.)	IC_{50} (ร้อยละ)
สารภี	12.50	44.57±2.57	15.14	0.63	44.06±0.99	0.72
	25.00	56.88±1.53		1.25	67.83±0.00	
	50.00	71.74±1.03		2.50	88.11±0.99	
	100.00	90.34±0.83		5.00	90.21±0.00	
	200.00	91.67±2.56		10.00	91.61±0.00	
เกสรบัวหลวง	0.06	7.97±1.03	0.82	0.06	7.97±0.72	0.34
	0.13	18.48±0.51		0.13	20.31±0.36	
	0.25	43.89±3.59		0.25	51.41±1.82	
	0.50	68.12±0.00		0.50	73.52±2.55	
	1.00	84.42±3.59		1.00	91.77±0.73	
ชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า	-	-	-	0.32	34.91±0.61	0.46
				0.63	67.67±0.61	
				1.25	85.78±0.62	
				2.50	90.52±1.22	
				5.00	92.67±0.61	
ชาชงชนิดหนึ่งในท้องตลาด	-	-	-	0.06	18.48±1.43	0.19
				0.13	37.97±1.79	
				0.25	64.30±0.36	
				0.50	86.33±0.00	
				1.00	100.00±0.77	
Gallic acid	0.19	15.11±1.02	0.72	-	-	-
	0.38	29.14±0.51				
	0.75	58.63±2.55				
	1.50	93.29±0.42				
	3.00	93.76±0.83				

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลและชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า

สารสกัด	ความเข้มข้น	ปริมาณฟีนอลิกรวม mgGAE.G^{-1}			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย (X̄±S.D.)
เอทานอล	**(mg/mL)**				
มะลิ	5	38.45	39.18	38.93	38.85±0.37
พิกุล	10	20.18	20.07	20.27	20.17±0.10
บุนนาค	1	15.96	14.74	20.82	17.17±3.22
สารภี	1	84.38	84.21	84.91	84.50±0.37
เกสรบัวหลวง	1	50.17	48.96	45.83	48.32±2.24

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลและชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า (ต่อ)

สารสกัด	ความเข้มข้น	ปริมาณฟีนอลิกรวม mgGAE.G^{-1}			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย ($\bar{X}$±S.D.)
ชาชง	**(ร้อยละ)**				
ชาชงพิกัดเกสรทั้งห้า	15	0.37	0.38	0.38	0.38±0.01
ชาชงชนิดหนึ่งในท้องตลาด	5	1.87	1.94	1.96	1.92±0.05

เอกสารอ้างอิง

1. Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM. (2015). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. [Electronic Journal]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 90 (17). 7915–7922.
2. Wang T, Li Q and Bi K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. [Electronic Journal]. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,** 13 (1). 12-23.
3. กองการประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวง สาธารณสุข. (2541). **ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย
4. นฤมล พูลไพบูลย์โรจน์. (2557). **การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของสารสกัดน้ำพิกัดเกสรทั้งห้าและองค์ประกอบของพิกัดต่อเซลล์แมคโครฟาจ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
5. สุนิษา สุวรรณเจริญ, อาภาพร บุญมี, พัชรี อาษาขันธ์, พิศชนก พิชญ์ภูมิสกุล, รุ่งอรุณ พลอาจ และ ธีรพิชญ์ เกษมสุข. (2560). พฤกษเคมีและฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญของสารสกัดดอกและใบยี่โถสีชมพู. [ฉบับอิเล็กทรอนิกส์]. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข,** 45 (3). 521-530.
6. Braca A, Sortion C, Politi M, Morelli I and Meddez J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Liccania licaniaeflora*. [Electronic Journal]. **Journal of Ethnopharmacology,** 79 (3). 379–381.
7. Gong Y, Liu X, He WH, Xu HG, Yuan F and Gao YX. (2012). Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. [Electronic Journal]. **Fitoterapia,** 83 (3). 481-489.
8. Joabe GM, Thiago ASA, Valérium TNAC, Daniela LVC, Maria DR, Silene CN, Elba LCA and Ulysses PA. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-Arid northeastern Brazil. [Electronic Journal]. **Molecules,** 15 (12). 8534-8542.
9. ลือชัย บุตคุป. (2555). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. [ฉบับอิเล็กทรอนิกส์]. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม,** 31 (4). 443-455.
10. Al-Fartosy AJM, Sameerah AZ and Alwan N. (2013). Total antioxidant capacity and antihyperlipidemic activity of alkaloid extract from aerial part of *Anethum graveolens* L. plant. [Electronic Journal]. **European Scientific Journal,** 9 (33). 413-423.
11. ณพัฐอร บัวฉุน. (2562). การวิเคราะห์พฤกษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทางานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสของบัวหลวง. [ฉบับอิเล็กทรอนิกส์]. **วารสารวิจัย มทร.กรุงเทพ,** 14 (1). 125-136.
12. สุธาทิพย์ อินทรกำธรชัย, นฤนันท์ วุฒิสินธุ์ และ ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ. (2556). **การพัฒนาครีมชะลอวัยผสมสารสกัดดอกมะลิลา.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

13. สุชาดา มานอก และ ปวีณา ลิ้มเจริญ. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. [ฉบับอิเล็กทรอนิกส์]. **ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์,** 15 (1). 106-117.