การทดสอบสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

นิสา จุลโพธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กุมภาพันธ์ 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ นิสา จุลโพธิ์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์ ..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา ..... ประธาน

(ดร.สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา)

ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์ ..... กรรมการ

(ดร.ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์)

..... กรรมการ

(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

..... กรรมการ

(ดร.ศิริพรรณ บรรหาร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 25 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์ และดร.อนันต์ อธิพรชัย อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัยพร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณสวนกล้วยไม้บูรณะออร์คิด ตำบลนครชัยศรี อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องของพันธุ์กล้วยไม้และดอกกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาเคมีศึกษาทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อชาญ จุลโพธิ์ คุณแม่สุภารัตน์ จุลโพธิ์ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

นิสา จุลโพธิ์

55990002: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: กล้วยไม้สกุลหวาย / สารพฤกษเคมี / ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

นิสา จุลโพธิ์ : การทดสอบสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *DENDROBIUM* spp.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์, Ph.D., อนันต์ อธิพรชัย, Ph.D. 88 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น จากการศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด พบสารพฤกษเคมีต่าง ๆ คือเทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และคูมาริน นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวยังได้ศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกรวม (1.15±0.34 ถึง 5.34±0.30 mgGAE/g) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (1.12±0.04 ถึง 4.01±0.12 mgQE/g) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (4.28±0.10 ถึง 5.28±0.19 mgAE/g) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่าสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้น 250.00 µg/mL (27.28%) รองลงมาเป็นสายพันธุ์เจสซิก้า (25.52%) สายพันธุ์บูรณะเจต (23.81%) และสายพันธุ์เอียสกุล (14.50%) ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-tyrosine และ L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดที่ความ เข้มข้น 1.00 mg/mL เมื่อใช้ซับสเตรทเป็น L-Tyrosine (90.99%) และ L-DOPA (52.24%) จากผลดังกล่าวข้างต้นพบว่าสามารถพัฒนาและนำดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ต่าง ๆ ไปใช้ประโยชน์ทางยาหรือเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอีกด้วย

55990002: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: *DENDROBIUM* SPECIES / PHYTOCHEMICAL SCREENING /
ANTIOXIDANT ACTIVITY / ANTI-TYROSINASE ACTIVITY

NISA JULLAPO: PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *DENDROBIUM* spp. ADVISORY COMMITTEE: PRAPAPAN TECHASAUVAPAK, Ph.D., ANAN ATHIPORNCHAI, Ph.D. 88 P. 2016.

The present study was performed to evaluate the phytochemical screening and biological activities of the ethanolic extracts from the flowers of *Dendrobium* species including Sonia Earsakul, Jessica, Buranajade and White Fairy. Phytochemical studies of the ethanolic extracts from *Dendrobium* spices flowers revealed that the presence of six secondary metabolites including terpenoids, steroids, cardiac glycosides, flavonoids, tannins and coumarins. The extracts were used to determine total phenolic content (1.15±0.34 to 5.34±0.30 mgGAE/g crude extract), total flavonoids content (1.12±0.04 to 4.01±0.12 mgQE/g crude extract) and total antioxidant capacity (4.28±0.10 to 5.28±0.19 mgAE/g crude extract). The highest antioxidant activity at 250.00 µg/mL using DPPH free radical scavenging method was demonstrated by *Dendrobium* spp. (White Fairy) (27.28%) followed by *Dendrobium* spp. (Jessica) (25.52%), *Dendrobium* spp. (Buranajade) (23.81%), and *Dendrobium* spp. (Sonia Earsakul) (14.50%), respectively. In addition, the ethanolic extracts of the flowers of *Dendrobium* species were evaluated for anti-tyrosinase activity using L-tyrosine and L-DOPA substrates. From these results, it was found that the ethanolic extract of *Dendrobium* spp. (White Fairy) showed the both highest anti-tyrosinase activities at 1.00 mg/mL using L-tyrosine (90.99%) and L-DOPA (52.24%). Fortunately, These results suggest the potential of *Dendrobium* species as medicine or cosmetic agents against free-radical-associated oxidative damage.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……. จ

สารบัญ……..... ฉ

สารบัญตาราง…….. ซ

สารบัญภาพ……..…….. ฌ

บทที่

1 บทนำ……...…….…… 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……..……..... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย……..……..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย..... 3

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ……..…..…… 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..……..…….. 5

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับกล้วยไม้สกุลหวาย.....…… 5

2.2 การสกัดสารจากพืช……...……..….. 10

2.3 การเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญของพืช……..……. 11

2.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น……..……..…… 12

2.5 สารพฤกษเคมีเบื้องต้น……..... 13

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ...……..... 16

2.7 สารประกอบฟีนอลิก……...…...……..…… 18

2.8 สารประกอบฟลาโวนอยด์……..……..…… 21

2.9 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส……...…...……..….. 21

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……...……..…….…… 24

3 วิธีดำเนินการวิจัย…….. 30

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี..... 30

3.2 แผนการดำเนินการวิจัย..... 32

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลการทดลองและอภิปราย…….. 39

4.1 การสกัดสารสกัดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย..... 39

4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น..... 40

4.3 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content : TPC) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric..... 41

4.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content : TFC) โดยใช้วิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric..... 42

4.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity : TAC) โดยใช้วิธี Phosphomolybdate colorimetric..... 44

4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging..... 46

4.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay) โดยมี L-tyrosine เป็นซับสเตรท..... 50

4.8 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay) โดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท..... 51

5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ…….....…….. 58

5.1 สรุปผลการวิจัย……..... 58

5.2 ข้อเสนอแนะ……..... 59

บรรณานุกรม…….. 60

ภาคผนวก…….. 64

ประวัติย่อของผู้วิจัย…….. 88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลกลุ่มต่าง ๆ…….……	19
2-2	ผลการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของใบและลำต้นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium panduratum* subsp. *villosum* Gopalan & A. N. Henry)……	28
2-3	ผลการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของรากกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium macraei*)……..	29
4-1	น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพ……	39
4-2	การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด……	40
4-3	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH radical inhibition) ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก, เคอร์ซิติน และวิตามินซี……..……	47
4-4	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH radical inhibition) ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด……..……	48
4-5	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-tyrosine เป็นซับสเตรท……..……...……	50
4-6	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท……..…….	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย……...…….……	6
2-2	ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอียสกุล…….…….……	7
2-3	ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เจสซิก้า……..…….……	8
2-4	ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์บูรณะเจต…….…….……	9
2-5	ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์ขาว 5 เอ็น…….…….……	10
2-6	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging……..……..…	17
2-7	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์…….…….…….……	21
2-8	ชีวสังเคราะห์ของเมลานิน…….…….…….……	23
2-9	โครงสร้างของสารที่พบในเอื้องเงิน (*Dendrobium draconis*)……..……	25
2-10	โครงสร้างหลักของ DNP จากกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium nobile* Lindl)...…	27
3-1	แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย……...…	32
4-1	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด...…	39
4-2	กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid).....…	41
4-3	ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ทั้ง 4 ชนิด……...…	42
4-4	กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซิติน (Quercetin)….....…	43
4-5	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ทั้ง 4 ชนิด……...…	44
4-6	กราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินซี (L-ascorbic acid)….....…	45
4-7	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด……...…….……...…	46
4-8	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก เคอร์ซิติน และวิตามินซี……..……...……..	47
4-9	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด……...……..	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-10	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-tyrosine เป็นซับสเตรท…..……...…..……..	51
4-11	ค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท……...……	52
4-12	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล……...……...……...……	53
4-13	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เจสซิก้า…….....……...……	54
4-14	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บูรณะเจต……...…….....……	55
4-15	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น……...……..……	56
4-16	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-tyrosine และ L-DOPA ของสารมาตรฐานกรดโคจิกและสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL…..…	57

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในแต่ละวันมนุษย์ต้องเผชิญกับภาวะความเครียด สารพิษต่าง ๆ ตลอดจนรังสีและความร้อนจากแสงอาทิตย์ส่งผลให้ร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น สภาวะที่เกิดความไม่สมดุลเช่นนี้ ทำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ขึ้นภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการเกิดโรคต่าง ๆ รวมทั้งกระบวนการที่ก่อให้เกิดริ้วรอยก่อนวัย (รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย และประพนธ์ วิไลรัตน์, 2538) ในปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ตลอดจนเครื่องสำอางเป็นจำนวนมาก เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ใกล้เคียงกับสารสังเคราะห์ ทั้งยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคสูงประกอบกับผู้บริโภคให้ความสนใจและนิยมใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากสารธรรมชาติมากขึ้น ตลอดจนสารที่สกัดได้จากธรรมชาติยังมีมากมายหลายชนิดที่ตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้แตกต่างกันไป โดยพบว่ากล้วยไม้เป็นพืชชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมนำไปเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ในการดูแลสุขภาพและความงามดังกล่าวเช่นกัน เนื่องจากมีหลากหลายพันธุ์ และให้สีสันที่สวยงาม

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Orchidaceae โดยจะแบ่งออกเป็นสกุลต่าง ๆ มากกว่า 800 สกุล ในประเทศไทยมีกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองอยู่ 176 สกุล 1,157 ชนิด (กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2555) 5 สกุลที่นิยมผลิตเป็นกล้วยไม้สดตัดดอกเพื่อการค้า ได้แก่ สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) สกุลออนซิเดียม (*Oncidium* spp.) สกุลอแรนดา (*Aranda* spp.) สกุลม็อคคารา (*Mokara* spp.) และสกุลแวนดา (*Vanda* spp.) ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นกล้วยไม้ที่พบได้ง่าย มีด้วยกันหลากหลายพันธุ์ เช่น ขาว 5 เอ็น, ขาวสนาน, โซเนีย 17 แดง, โจแดง, เอียสกุล, ซากุระ, แอนนา, อินทุวงศ์, เจสซิก้า และ บูรณะเจต เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2548) จากการศึกษางานวิจัยพบว่า กล้วยไม้สกุลหวาย มีลักษณะเด่น คือ ดอกมีสีม่วง ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) มีสารไซยานิดิน (Cyanidin) และพิโอนิดิน (Peonidin) (พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์, 2557) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่า ส่วนของดอกกล้วยไม้หวายม่วงแดง (*Dendrobium* Sonia) มีสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกับวิตามินซี ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (Reference standard) พบว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึงประมาณ 87.45% เปรียบเทียบ

กับวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 96.00% รวมถึงมีการนำเอาสารสกัดจากดอกกล้วยไม้สายพันธุ์ต่าง ๆ มาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อช่วยบำรุงและปกป้องผิวจากมลภาวะภายนอก และลดเรือนริ้วรอย อีกทั้งยังพบว่ามีการนำส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้สายพันธุ์นี้ เช่น หัวใต้ดิน หรือ ดอก ไปใช้ทางการแพทย์ ตลอดจนมีการทดสอบความปลอดภัยเพื่อใช้ในมนุษย์ (วรพร ศีลศร, 2554)

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสี วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม จากสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิดที่หาพบได้ง่าย ได้แก่ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต ที่ได้จากสวนกล้วยไม้บูรณะออร์คิด ต.นครชัยศรี อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์ในเครื่องสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

2. เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

3. เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

4. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโร-ซิเนส ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เตรียมสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต ที่เก็บจากสวนกล้วยไม้บูรณะออร์คิด ต.นครชัยศรี อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

2. ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

3. หาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

2. ทำให้ทราบปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

3. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และสายพันธุ์บูรณะเจต

4. จากข้อมูลที่ได้อาจจะนำสารสกัดหยาบของกล้วยไม้ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในด้านเครื่องสำอางและยาต่อไป

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) คือ พืชที่อยู่ในวงศ์ Orchidaceae

2. การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากพืชโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี (Color reaction) ซึ่งจะให้ผลการทดสอบเป็นสีต่าง ๆ หรือการเกิดตะกอน เพื่อบอกถึงกลุ่มสารเคมีที่สำคัญ

3. ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) หมายถึง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบของตัวอย่างที่สนใจโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

4. ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content) หมายถึง ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบของตัวอย่างที่สนใจโดยใช้วิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric

5. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant capacity) หมายถึง ปริมาณสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรวมในสารสกัดหยาบของตัวอย่างที่สนใจ โดยใช้วิธี Phospho-molybdate colorimetric

6. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radicals scavengers) หมายถึง ความสามารถในการต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัดหยาบของตัวอย่างที่สนใจ โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging

7. ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (Inhibition enzyme tyrosinase activities) หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสี โดยใช้วิธี Dopachrome

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*)

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledonae) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีถิ่นกำเนิดในบริเวณกว้างตั้งแต่ประเทศจีน อินเดีย ลงมาคาบสมุทรมาลายูไปจนถึงเกาะนิวกินี ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ แต่สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายที่ปลูกเลี้ยงในประเทศไทยจะเป็นพันธุ์ลูกผสมของกล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของประเทศออสเตรเลีย อินโดนีเซีย และปาปัวนิวกินี คือ กล้วยไม้สกุลหวาย ในหมู่ Phalaenanthe (หวายฟอร์มกลม) ได้แก่ *Dendrobium phalaenopsis*, *Dendrobium bigibum* และหมู่ Ceratobium (หวายกลีบบิด) ได้แก่ *Dendrobium stratiotes*, *Dendrobium schulleri*, *Dendrobium taurinum*, *Dendrobium discolor* และ *Dendrobium veratrifolium* (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551) เนื่องจากกล้วยไม้สกุลหวายเป็นพืชที่มีวิวัฒนาการและการปรับตัวอย่างสูงในหลายรูปแบบจึงสามารถกระจายพันธุ์อยู่ได้ทั่วทุกภูมิภาคของโลก ทั้งยังมีความหลากหลายทางพันธุ์ สีดอกและลำต้น (มาลินี อินทร์วงศ์, 2553) มีอายุการใช้งานนานจึงมีการปลูกเลี้ยงอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้วยไม้จนกระทั่งให้ดอก ตัดดอก บรรจุหีบห่อ และส่งออก (สุกัญญา จันทกุล, อารยะ ไทยเที่ยง และศักรินทร์ หงส์รัตนาวรกิจ, 2556)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตแบบแตกกอ (Sympodial) ลำต้นจริง เรียกว่า เหง้า (Rhizome) ซึ่งเจริญเติบโตในแนวขนานกับผิวหน้าของวัสดุปลูก ส่วนที่เจริญขึ้นมาเหนือวัสดุปลูกเป็นลำต้นเทียม เรียกว่า ลำลูกกล้วย (Pseudobulb) รากของกล้วยไม้จะมีลักษณะอวบน้ำ เป็นรากอากาศ ไม่มีรากฝอย ด้านนอกมีเนื้อเยื่อหนาคล้ายเป็นนวมหุ้ม เรียกว่า Velamen ซึ่งสามารถดูดซับน้ำและแร่ธาตุเข้าไปยังภายในเซลล์ของรากกล้วยไม้ได้ สำหรับใบของกล้วยไม้จะมีลักษณะแบนเป็นแผ่นกว้างและหนา จำนวนหลายใบ ออกเรียงสลับกันตลอดลำลูกกล้วย และแน่นทางปลายยอด (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551)

กล้วยไม้สกุลหวายมีลักษณะช่อดอก (Inflorescence) เป็นแบบ Racemose ซึ่งเป็นช่อดอกที่มีลักษณะส่งก้านยาวโดยไม่แตกแขนง จะออกช่อดอกจากตาที่อยู่ตามข้อใกล้ปลายยอดหรือที่ปลายยอดของลำลูกกล้วยดอกที่โคนช่อดอกจะบานและบานไล่ไปที่ดอกอ่อนกว่าตามลำดับและขึ้นไปยังปลายยอดของช่อที่มีดอกอ่อนที่สุด ดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ (Hermaphroditic หรือ Bisexual flower) คือ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่บนส่วนเดียวกัน มีลักษณะเป็นเดือยหรือส่วนที่

ยื่นออกมาจากดอก เรียกว่า เส้าเกสร (Column) (สุกัญญา จันทกุล, อารยะ ไทยเที่ยง และศักรินทร์ หงส์รัตนาวรกิจ, 2556) ดอก ประกอบด้วยกลีบดอก 6 กลีบ กลีบชั้นนอก 3 กลีบ ชั้นใน 3 กลีบ กลีบชั้นในกลีบล่างมีขนาดเล็กเรียกชื่อเฉพาะว่า ปาก หรือ กระเป๋า ดอกของกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายสามารถแบ่งได้เป็น 4 รูปแบบตามขนาดความกว้างและรูปร่างของกลีบดอก คือ ดอกฟอร์มกลม กึ่งฟอร์มกลม กลีบแคบ และกลีบบิด เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ส่วนของก้านชูยอดเกสรตัวเมียกับก้านชูอับเรณูของเกสรตัวผู้อยู่รวมกันเรียกว่า เส้าเกสร ส่วนปลายสุดของเส้าเกสรเป็นละอองเกสรตัวผู้ที่เกาะรวมกันเป็นก้อนแข็งสองก้อน โดยมีฝาครอบปิด ส่วนของเส้าเกสรที่อยู่ถัดลงมาเป็นยอดเกสรตัวเมียที่มีลักษณะเป็นแอ่งกลม ๆ มีน้ำเหนียว ๆ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551)

ภาพที่ 2-1 ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย : (ก) *Dendrobium* Sonia ‘BOM 17 Red’
(ข) *Dendrobium* Pink Sem ‘Rinnapa’ (ค) *Dendrobium* White Sanan
(ง) *Dendrobium* Sonia Earsakul
(ที่มา: http://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/iro/pdf/e_thailand.pdf)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ที่ศึกษา

จากที่กล่าวมาแล้วในเบื้องต้นว่า กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นสกุลที่อยู่ตามธรรมชาติมากมายหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งผู้วิจัยได้สนใจศึกษากล้วยไม้หวายใน 4 สายพันธุ์ ดังนี้

2.1.2.1 กล้วยไม้หวายพันธุ์เอียสกุล ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrobium* spp. ‘Sonia Earsakul’ ชื่อสามัญ (ไทย) เอียสกุล กลายพันธุ์มาจาก *Dendrobium* spp. ‘Sonia Jo Daeng’ ลักษณะประจำพันธุ์ ลำต้นมีลักษณะเป็นลำลูกกล้วยรูปรี ยาวประมาณ 45.30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.56 เซนติเมตร ใบเป็นรูปรี ยาวประมาณ 14.50 เซนติเมตร กว้างประมาณ 6.02 เซนติเมตร ดอกไม่มีกลิ่นฟอร์มดอกกึ่งฟอร์มกลม กว้างประมาณ 5.68 เซนติเมตร ยาวประมาณ 7.09 เซนติเมตร ความยาวทั้งช่อประมาณ 53.05 เซนติเมตร จำนวนดอกบนช่อ 10-13 ดอก การเรียงตัวของดอกบนช่อดอก 2 แถว จำนวนช่อดอกต่อลำลูกกล้วย 3-5 ช่อดอก อายุการใช้งานเฉลี่ย 16 วัน สีพื้นกลีบดอกเป็นสีขาว สีระบายกลีบดอกเป็นสีม่วงเข้ม เป็นพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงง่าย ต้นเจริญเติบโตดี ทรงช่อสวย ทนต่อสภาพอากาศไม่ค่อยประสบปัญหาเรื่องดอกตูม ฝ่อและร่วง (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ภาพที่ 2-2 ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอียสกุล *Dendrobium* spp. ‘Sonia Earsakul’

2.1.2.2 กล้วยไม้หวายพันธุ์เจสซิก้า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrobium* spp. Jessica ชื่อสามัญ (ไทย) เจสซิก้า ลักษณะประจำพันธุ์ ลำต้น มีลักษณะเป็นลำลูกกล้วยแถบ ยาวประมาณ 60.45 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.55 เซนติเมตร ใบเป็นรูปไข่กลับ ยาวประมาณ 17.14 เซนติเมตร กว้างประมาณ 5.64 เซนติเมตร ดอกไม่มีกลิ่น ฟอร์มดอกกลม กว้างประมาณ 5.82 เซนติเมตร ยาวประมาณ 6.00 เซนติเมตร ความยาวทั้งช่อประมาณ 51.95 เซนติเมตร จำนวนดอกบนช่อ 12-16 ดอก การเรียงตัวของดอกบนช่อดอก 2 แถว จำนวนช่อดอกต่อลำลูกกล้วย 3-7 ช่อดอก อายุการใช้งานเฉลี่ย 9 วัน สีพื้นกลีบดอกเป็นสีขาว สีระบายกลีบดอกเป็นสีม่วงอ่อน ปลูกเลี้ยงง่าย ให้หน่อใหม่เร็ว ต้นมักมีการต่อยอด ช่วงแล้งให้ผลผลิตน้อย ช่วงสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงมักมีดอกตูม ฝ่อ และร่วง (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ภาพที่ 2-3 ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เจสซิก้า *Dendrobium* spp. Jessica

2.1.2.3 กล้วยไม้หวายพันธุ์บูรณะเจต ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrobium* spp. Burana Jade ชื่อสามัญ (ไทย) บูรณะเจต ลักษณะประจำพันธุ์ ลำต้น มีลักษณะเป็นลำลูกกล้วยรูปไข่กลับ ยาวประมาณ 103 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.37 เซนติเมตร ใบเป็นรูปรี ยาวประมาณ 15.71 เซนติเมตร กว้างประมาณ 11.12 เซนติเมตร ดอกไม่มีกลิ่น ฟอร์มดอกกึ่งฟอร์มกลม กว้างประมาณ 4.72 เซนติเมตร ยาวประมาณ 4.30 เซนติเมตร ความยาวทั้งช่อประมาณ 77.00 เซนติเมตร จำนวนดอกบนช่อ 16-40 ดอก การเรียงตัวของดอกบนช่อดอก 3 แถว จำนวนช่อดอกต่อลำลูกกล้วย 3-7 ช่อดอก อายุการใช้งานเฉลี่ย 10 วัน สีพื้นกลีบดอกเป็นสีเหลืองอมเขียว กลีบดอกหนา ปากสีม่วง เป็นพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงง่ายโตเร็ว ลำต้นอ้วนสูง ให้ผลผลิตดี ช่อดอกยาว ก้านช่อแข็ง ช่วงสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงไม่ค่อยประสบปัญหา เรื่อง ดอกตูม ฝ่อ และร่วง (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ภาพที่ 2-4 ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์บูรณะเจต *Dendrobium* spp. Burana Jade

2.1.2.4 กล้วยไม้หวายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrobium* spp. White Fairy ชื่อสามัญ (ไทย) ขาว 5 เอ็น ลักษณะประจำพันธุ์ ลำต้น มีลักษณะเป็นลำลูกกล้วยรูปรี ยาวประมาณ 44.70 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.50 เซนติเมตร ใบเป็นรูปไข่แคบ ยาวประมาณ 16.53 เซนติเมตร กว้างประมาณ 4.90 เซนติเมตร ดอกมีกลิ่นหอม ฟอร์มดอกกึ่งฟอร์มกลม กว้างประมาณ 4.86 เซนติเมตร ยาวประมาณ 5.06 เซนติเมตร ความยาวทั้งช่อประมาณ 52.55 เซนติเมตร จำนวนดอกบนช่อ 12-19 ดอก การเรียงตัวของดอกบนช่อดอก 3 แถว จำนวนช่อดอกต่อลำลูกกล้วย 2-4 ช่อดอก อายุการใช้งานเฉลี่ย 12 วัน สีพื้นกลีบดอกสีขาว ปากสีเหลือง เป็นพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงง่าย ให้ผลผลิตดี ดอกดก ช่อยาว มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ กลีบดอกกว้าง และหนา เมื่อสภาพอากาศเปลี่ยนแปลง มักประสบปัญหาเรื่องดอกตูม ฝ่อและร่วง โดยเฉพาะช่วงปลายฤดูร้อนหรือต้นฤดูฝน (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ภาพที่ 2-5 ลักษณะของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์ขาว 5 เอ็น *Dendrobium* spp. White Fairy

จากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับกล้วยไม้สกุลหวาย ผู้วิจัยได้เลือกศึกษากล้วยไม้สกุลหวาย 4 สายพันธุ์ดังที่กล่าวมาในข้างต้น เพราะเป็นดอกกล้วยไม้ที่มีกลีบดอกใหญ่ มีสีสวยงาม สีสันสดใส และมีดอกออกตลอดปี ทั้งยังมีคุณสมบัติเหมาะในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการตั้งตำรับในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อสุขภาพและเสริมความงาม

2.2 การสกัดสารจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน ได้แก่ (วรพร ศีลศร, 2554)

2.2.1 การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช โดยวิธีการหมักตัวอย่างพืชกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถที่ปิดสนิท ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้แล้วนำไปกรอง อาจต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้สารสกัดทั้งหมด ข้อดีของวิธีนี้คือ สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.2.2 การแช่สกัดต่อเนื่อง (Percolation) เป็นวิธีสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือ Percolator วิธีการคือ นำตัวอย่างพืชมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อย ๆ บรรจุตัวอย่างพืชทีละชั้นลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือตัวอย่างพืชประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยการเติม

ตัวทำละลายเหนือตัวอย่างพืชอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้แล้วนำไปกรองข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นการสกัดสารจากพืชได้สมบูรณ์และไม่ใช้ความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน

2.2.3 การสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extractor) เป็นวิธีสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน Flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Thimble) ซึ่งบรรจุตัวอย่างพืชไว้ เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (Extracting chamber) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำสารสกัดจะไหลกลับลงไปใน Flask ด้วยวิธีกาลักน้ำ Flask นี้ได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (Heating mantle) หรือหม้ออังน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ใน Flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ Condensor จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลายแต่มีการใช้ความร้อนอาจทำให้สารสำคัญบางตัวสลายไป

2.3 การเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญของพืช

ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารจากพืชต้องมีคุณสมบัติดังนี้ คือเป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ และราคาไม่แพง ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ดังนี้

1. สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน

2. ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุดขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด

3. แรงที่เกี่ยวข้องในการละลาย ได้แก่ แรงแผ่กระจาย (Dispersion force) แรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipole-dipole force) และพันธะไฮโดรเจน (H-bonding)

โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะกับสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมาะกับสารที่ไม่มีขั้ว การผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว อาจทำให้การละลายดีขึ้น บางครั้งการเลือกตัวทำละลายอาจพิจารณาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารตัวทำละลายอาจจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากดังนี้ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตต, อะซิโตน, เอทานอล, เมทานอล และน้ำ

ตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ

1. เฮกเซน (Hexane) เหมาะสำหรับสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายเหมาะสำหรับกำจัดไขมันจากตัวอย่างพืช มีราคาถูก

2. อีเทอร์ (Ether) ความสามารถในการละลายน้อยกว่า Chloroform แต่มี selectivity ดีกว่า

3. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นตัวทำละลายที่ดี แต่มี selectivity น้อย เกิดอิมัลชันง่าย ข้อเสีย ระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิดออกไซด์ได้ง่ายและดูดน้ำได้มาก

4. แอลกอฮอล์ (Alcohol) นิยมใช้เมทานอล และเอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญ เนื่องจากมีความสามารถในการละลายกว้างมาก

2.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี คือ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

2.4.1 การระเหย (Free evaporation) การระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Water bath) หรือแผ่นความร้อน (Hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องมาจากอุณหภูมิสูงเกินไป

2.4.2 การกลั่นในสภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuum) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator)

2.4.3 การทำให้แห้ง (Drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง เช่น การใช้ความเย็น (Freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (Spray dryer) เป็นต้น

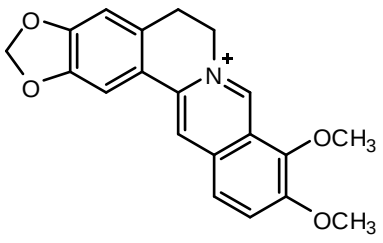
2.4.4 อัลตราฟิลเทรชั่น (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (Membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000

จากที่กล่าวมาในเบื้องต้น จะพบว่าการสกัดสารสำคัญจากพืช การเลือกใช้ตัวทำละลายและการทำสารสกัดให้เข้มข้นทำได้หลายวิธี ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีการสกัดสารจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการหมัก (Maceration) เนื่องจากมีความเหมาะสมในการสกัดส่วนของดอก ซึ่งมีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมาก ทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อนโดยจะไม่ทำให้สารสำคัญบางตัวสลายไปและใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ตลอดจนวิธีการทำสารสกัดให้เข้มข้นด้วยวิธีการกลั่นในสภาวะสุญญากาศ

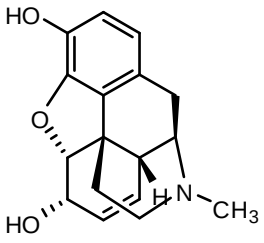
2.5 สารพฤกษเคมีเบื้องต้น

สารพฤกษเคมีที่พบในพืชประกอบด้วย สารปฐมภูมิ (Primary Constituents) และสารทุติยภูมิ (Secondary Constituents) สารปฐมภูมิประกอบด้วย แป้ง โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างจาก Intermedial basic metabolism มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ มีโครงสร้างง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน สารทุติภูมิเป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางเคมี (Chemotaxonomy Group) ประกอบด้วย แอลคอลอยด์ (Alkaloid) ไกลโคไซด์ (Glycoside) แทนนิน (Tannins) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) และสเตอรอยด์ (Steroid) (อุดมเดชา พลเยี่ยม, 2556)

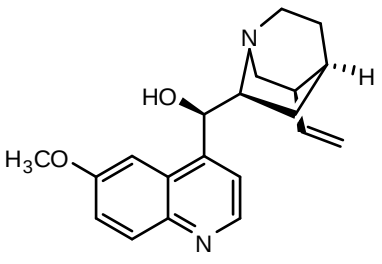
2.5.1 แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นด่าง มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มักพบในพืชชั้นสูง แอลคาลอยด์ มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย คุณสมบัติของแอลคาลอยด์ คือ ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนใหญ่มีรสขม แอลคาลอยด์ส่วนมากจะเป็นผลึกไม่มีสี ยกเว้น ชนิดที่มีพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยว (Conjugated double bond) เช่น Berberine มีสีเหลือง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด (สาร Morphine ในยางของผลฝิ่น) ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน รักษาโรคมาเลเรีย (Quinine ในเปลือกต้นซิงโคนา) และยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น



Berberine

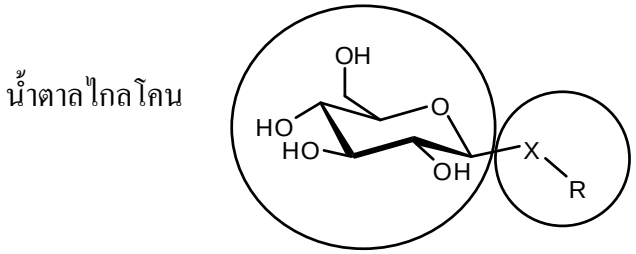


Morphine



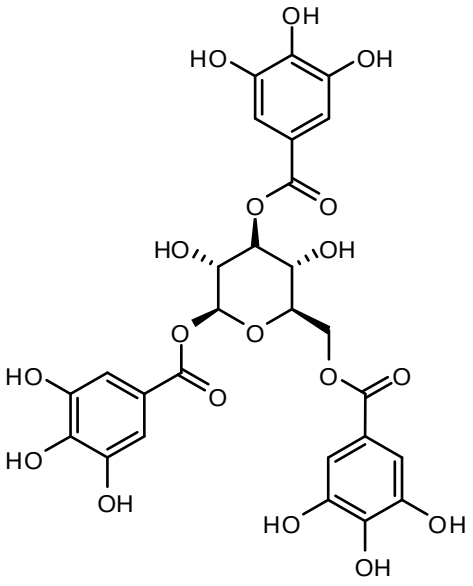
Quinine

2.5.2 ไกลโคไซด์ (Glycoside) เกิดจาก Aglycone หรือ Genin จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (Glycone part) ละลายน้ำได้ดี ไกลโคไซด์จำแนกตามโครงสร้างของ Aglycone ได้หลายประเภท เช่น คาร์ดิแอค ไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (Anthraquinone glycosides) ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) ไซยาโนเจนนิติก ไกลโคไซด์ (Cyanogenatic glycosides) ไอโซไทโอไซยาเนท ไกลโคไซด์ (Isothiocyanate glycosides) ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Favonol glycosides) และแอลกอฮอลิค ไกลโคไซด์ (Alcoholic glycosides) เป็นต้น



Glycoside compounds

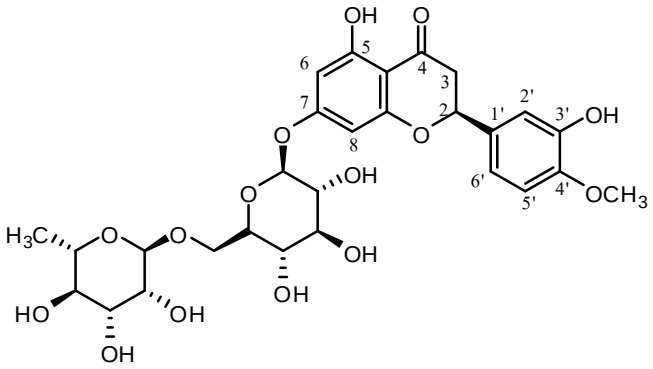
2.5.3 แทนนิน (Tannins) เป็นสารที่พบในพืชทั่วไป มีรสฝาด มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน และสามารถตกตะกอนโปรตีนได้ เช่น ตกตะกอนเจลาติน และเป็นสารที่ไม่ตกผลึก เมื่อนำมาละลายในน้ำจะให้สารละลายคอลลอยด์ มีฤทธิ์ฝาดสมานและฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบในใบฝรั่ง เนื้อของกล้วยน้ำว้าดิบ ประโยชน์ของแทนนิน ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ทำให้หนังเป็นเงางามและทนทาน และเป็นยาแก้ท้องเสีย เนื่องจากมีฤทธิ์ฝาดสมาน



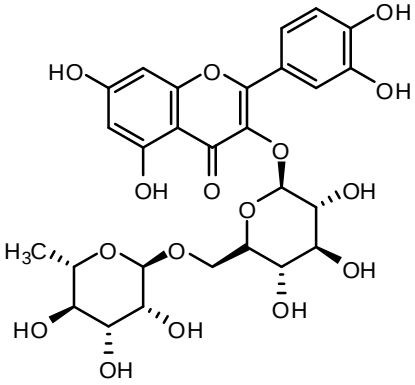
Tannin

2.5.4 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) พบได้ทุกส่วนของพืช เป็นสารมีสีทำให้ดอกไม้มีสีสันสวยงาม คุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ คือ เป็นสารโพลีฟีนอล (Polyphenolic compound) ส่วนใหญ่เป็น o-glycoside พบเป็น c-glycoside บ้าง และน้ำตาลมักจับตำแหน่ง 3, 5 หรือ 7 ของ Aglycone บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ทำให้เส้นเลือดฝอยแข็งแรง ต้านเชื้อไวรัส ลดการอักเสบ

สารสำคัญกลุ่มนี้ ได้แก่ Hesperidin และ Rutin ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้ผนังเส้นเลือดฝอยแข็งแรง ไม่เปราะ ใช้รักษาโรคริดสีดวงทวาร

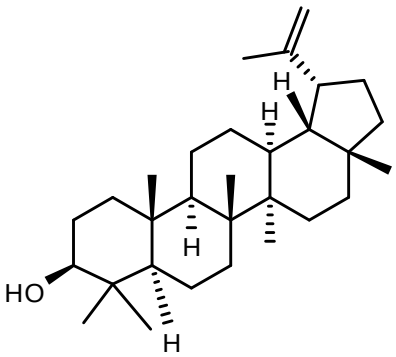


Hesperidin

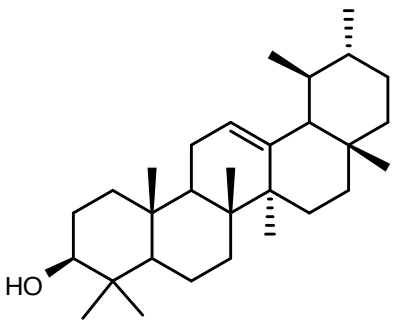


Rutin

2.5.5 เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene units) หรือเรียกว่า ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) สารประกอบประเภทเทอร์ปีนอยด์ พบกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะพืชชั้นสูง นอกจากนี้ยังพบในเชื้อรา แมลง จุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น sesquiterpenes พบในฮอร์โมนของแมลง diterpenes พบในสัตว์ทะเลจำพวกฟองน้ำ triterpenes มักพบในพืชในรูปของ cardiac glycosides, saponin และ phytosterol ตัวอย่างเช่น lupeol และ α-amyrin ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท triterpenoids ที่พบในพืชทุกชนิด



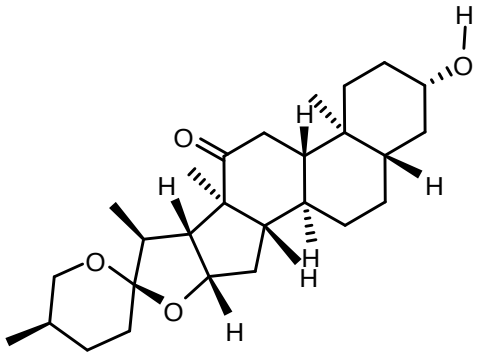
Lupeol



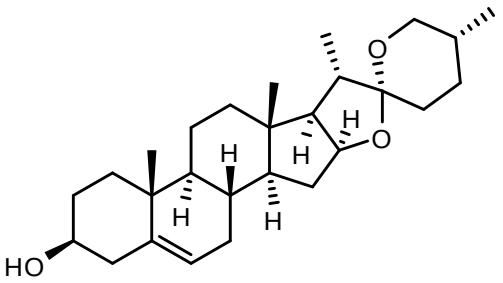
α -Amyrin

2.5.6 สเตียรอยด์ (Steroid) เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น cyclopentano perhydro phenanthrene nucleus เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมน และยาต้านอักเสบ อาจแบ่ง

เป็น Steroidal saponins ซึ่งที่พบมักมีสูตรโครงสร้างเป็น 6 วงแหวน ในธรรมชาติพบทุกตัวในรูปของไกลโคไซด์ นำมาใช้เป็นยาต้านการอักเสบ หรือใช้เป็นยารักษาโรคหัวใจ ในขณะที่ Triterpenoid saponins พบได้ในธรรมชาติในรูป Triterpene อิสระ หรือ ไกลโคไซด์ Triterpenoid saponins บางชนิดใช้เป็นยาลดความดันโลหิตยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยาคุมกำเนิดหลายชนิด เช่น Hecogenin ซึ่งได้จาก *Agave sisalana* ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ corticosteroids สาร Diosgenin ซึ่งได้จาก *Dioscorea* spp. เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ยาคุมกำเนิดและฮอร์โมนเพศ เป็นต้น (นพมาศ สุนทรเจริญ, 2544)



Hecogenin



Diosgenin

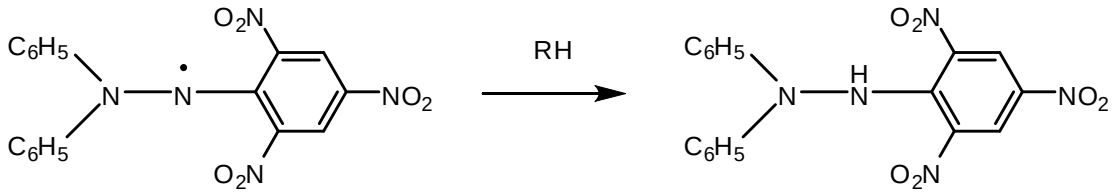
2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารอนุมูลอิสระ (Free radicals) หรือ Reactive Oxygen Species (ROS) เป็นโมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ภายในร่างกายเพื่อให้ตัวมันเสถียร แหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในตัวคน มี 2 แหล่ง คือ จากภายในร่างกาย เช่น การเผาผลาญอาหาร การหายใจ การออกกำลังกายและจากแหล่งภายนอกร่างกายที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ ความเครียด การติดเชื้อ มลพิษในอากาศ เป็นต้น อนุมูลอิสระมีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ไฮดรอกซิลแรดดิเคิล (Hydroxyl radical) เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น จึงเกิดการทำลายโมเลกุลอื่น ๆ ต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกาย เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า รอบดวงตา และผิวพรรณ รวมทั้งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด ต้อกระจก ความดันโลหิตสูง อัลไซเมอร์ เบาหวาน และมะเร็ง เป็นต้น ปกติภายในร่างกาย มีกลไกป้องกันการโจมตีจากอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ Superoxide

dismutase (SOD), Catalase และ Glutathione peroxidase เป็นต้น แต่การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัด ประกอบกับเมื่ออายุมากขึ้น ร่างกายจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้น้อยลง ดังนั้นร่างกายจึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกด้วยเช่นกัน

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidants) ที่รู้จักกันดี ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม เบต้าแคโรทีน วิตามินเอ และพฤกษเคมีต่าง ๆ (Phytochemical) เช่น โพลีฟีนอล (Polyphenol) และไอโซฟลาโวน (Isoflavone) เป็นต้น ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติในเภสัชภัณฑ์ และส่วนประกอบอื่น ๆ ในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เช่น สารกันบูดในอาหาร และเครื่องสำอางอีกด้วย

สำหรับวิธีการทดสอบที่นิยมใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น จะเรียกว่า วิธี DPPH (DPPH radical scavenging assay) โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2-6



2,2-diphenyl-1-picryhydrazine (DPPH·) DPPH : H

ภาพที่ 2-6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

ดังนั้นความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย (นิยมใช้ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระมาก เพราะใช้งานง่าย) โดยในการทดสอบนี้จะให้ DPPH (มีสีม่วงเข้ม) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (วรพร ศีลศร, 2554)

2.7 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)

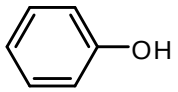
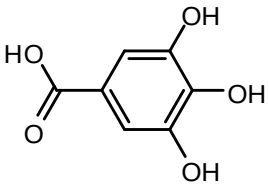
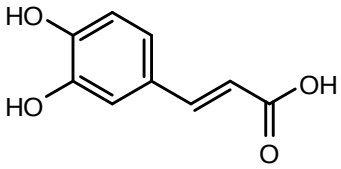
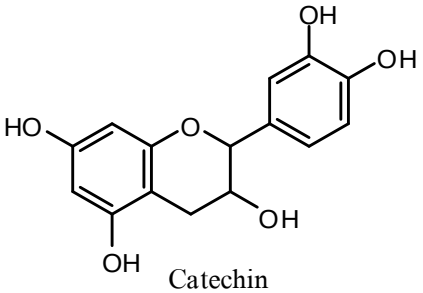
สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืช มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลต และป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็ง สารกลุ่มนี้ถูกจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ซึ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยเหล่านี้ที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารยา และเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน สารประกอบฟีนอลิก คือ สารที่มีสูตรโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) บนวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. ฟีนอลทั่วไป กรดฟีนอลิก และอนุพันธ์ เช่น Gallic acid, Ellagic acid, Tannic acid, Vanillin, Catechol, Resorcinol และ Salicylic acid เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่น Raspberry และ Blackberry

2. ฟีนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกที่วงแหวนอะโรมาติก มีสายโซ่คาร์บอน 3 คาร์บอนเกาะอยู่ แยกย่อยออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ Hydroxycinnamic acid (Ferulic acid, Caffeic acid หรือ Coumaric acid) , Coumarins (Umbelliferone, Scopoletin, Aesculetin หรือ Psoralen) , Lignans (Pinoresinol, Eugenol หรือ Myristicin) พบได้ในแอปเปิ้ล แพร์ และกาแฟ

3. ฟลาโวนอยด์ เป็นกลุ่มสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น C6-C3-C6 แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ Catechins, Proanthocyanins, Anthocyanidines, Flavones, Flavovols, Flavonones และ Isoflavones จากการที่พบ Flavonoid ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งพืช ผัก ผลไม้ รวมทั้งเครื่องดื่มที่เตรียมมาจากพืช เช่น ชาพบว่าในใบชาจะมี Catechins อยู่ถึง 30% ของน้ำหนักแห้ง และเชื่อว่าเป็นสาระสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ Chemoprevention โดย Anthocyanins เป็นสารที่มีสีในพืช ส่วนกลุ่ม Flavones, Flavonols และ Isoflavones จะพบได้ทั่วไป และเชื่อว่าเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

ตารางที่ 2-1 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มต่าง ๆ

Class	Basic Skeleton	Sample
Simple phenols	C_6	 Phenol
Phenolic acid	C_6-C_1	 Gallic acid
Phenylpropanoids	C_6-C_3	 Caffeic acid
Flavonoids	C_6-C_3-C_6	 Catechin

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ในกระบวนการเติบโตและการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ดังนั้นรูปแบบของสารประกอบฟีนอลในพืชแต่ละชนิดจึงมีความแตกต่างกันไป ในปัจจุบันพบว่ามีสารประกอบฟีนอลที่ทราบโครงสร้างแน่นอนแล้วมากกว่า 8000 ชนิด ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นโพลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (Lignins) โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าว อาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharides) หรือ โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) ก็ได้ แต่น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก คือ กลูโคส (Glucose) นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกัน

ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acids) กรดอินทรีย์ (Organic acids) อะมีน (Amines) และไขมัน ในปัจจุบันสารประกอบฟีนอลิกได้รับความสนใจในฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidation) และฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagenic activity) ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) และการใช้สารประกอบฟีนอลิกในการป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ROO^{\cdot} + PHH \longrightarrow ROOH + PP^{\cdot}$$

$$RO^{\cdot} + PHH \longrightarrow ROH + PP^{\cdot}$$

เมื่อ $ROO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ คือ Free radicals, PPH คือ Polyphenolic Compounds

เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้ด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

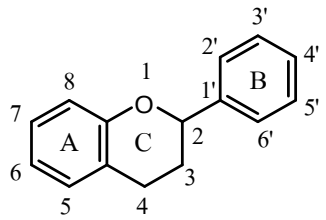
$$ROO^{\cdot} + PP^{\cdot} \longrightarrow ROOPP$$

$$RO^{\cdot} + PP^{\cdot} \longrightarrow ROPP$$

สารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้น สามารถพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เมล็ด (ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าว และงา) ผล (ได้แก่ องุ่น ส้ม และพริกไทยดำ) ใบ (ได้แก่ ชา และเครื่องเทศต่าง ๆ) ดอก (ได้แก่ กล้วยไม้) และส่วนอื่น ๆ (ได้แก่ มันเทศ และหัวหอม) สารประกอบฟีนอลิกที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ Flavonoids และ Cinnamic acid derivatives โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช แต่จะมีความแตกต่างกันในด้านของชนิดและปริมาณ (วรพร ศีลศร, 2554)

2.8 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid Compound)

สารประกอบฟลาโวนอยด์พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ ดอก ผล หรือเมล็ด มีโครงสร้างหลักเป็นไดฟีนิลโพรเพน (Diphenylpropane) ประกอบด้วยคาร์บอนทั้งหมด 15 อะตอม ที่มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานเป็น C6-C3-C6 จัดเรียงตัวเป็นวงแหวนจำนวน 3 วงเรียงต่อกัน เรียกเป็นวงแหวน A, B และ C โดยวงแหวน A และ B เป็น Phenyl ring ส่วนวงแหวน C เป็น Lactone ring ดังภาพที่ 2-7 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่วงแหวน C หรือเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิลเลชัน (Hydroxylation) ที่วงแหวน A และ B มีผลทำให้เกิดอนุพันธ์ของสารฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ มากมาย ส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน สารฟลาโวนอยด์สามารถเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาลทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยส่วนของน้ำตาลมักจะจับที่ตำแหน่ง 3, 5 หรือ 7 ของวง เรียกว่า ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์



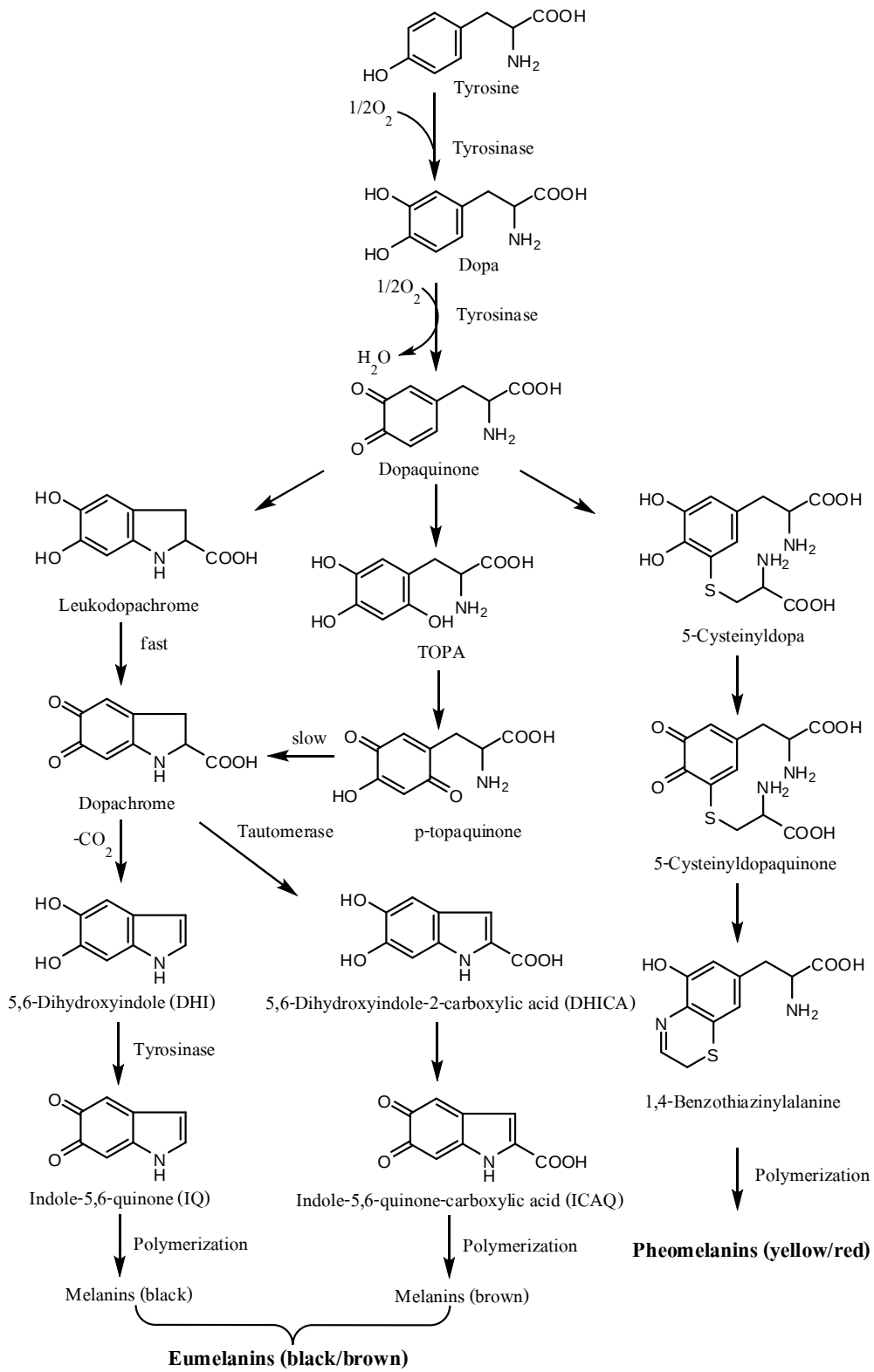
ภาพที่ 2-7 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือต้านออกซิเดชัน โดยประสิทธิภาพของการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับโครงสร้างและหมู่ที่เข้ามาแทนที่ เช่น หากมีหมู่ 3-hydroxyl (3-OH) เข้ามาแทนที่บริเวณวงแหวน C จะทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันมากขึ้น ในขณะที่หากมีหมู่ hydroxyl เข้ามาแทนที่ในตำแหน่ง 5 และ 7 จะมีผลต่อประสิทธิภาพของการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าการเข้ามาแทนที่ในตำแหน่งที่ 3 นอกจากนี้สารประกอบฟลาโวนอยด์ยังมีสมบัติในการต้านการเกิดมะเร็ง มีความสามารถในการป้องกันการแตกตัวของเส้นเลือด ยับยั้งการอักเสบ ช่วยลดปริมาณ LDL Cholesterol ซึ่งจะส่งผลให้เกิดอาการหลอดเลือดแดงตีบตัน เป็นต้น (จุฑารัตน์ ทวีกิจโภไคย, 2554)

2.9 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ ในมนุษย์เอนไซม์ไทโรซิเนส เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสีดำหรือน้ำตาลของผิวหนังหรือเส้นผม ในพืช

ไทโรซิเนส ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างสีน้ำตาลดำ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหมองคล้ำของสีผิวผักผลไม้ ในสัตว์พวกแมลงบางชนิด เอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย (กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, 2551) ซึ่งกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยปกติผิวหนังจะมีกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ซึ่งผลิตโดยเมลาโนไซต์ พบได้ในชั้นล่างสุดของผิวหนังชั้นกำพร้า การสังเคราะห์เมลานินภายในเมลาโนไซต์ต้องอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนสในกระบวนการผลิตเมลานิน โดยเมลานินที่สร้างขึ้น แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ยูเมลานิน (Eumelanin) เป็นสารให้สีน้ำตาลหรือน้ำตาลค่อนข้างดำ พบในคนเอเชียและแอฟริกา และฟีโอเมลานิน (Pheomelanin) ทำให้เกิดผิวสีเหลืองหรือขาว พบได้ในคนยุโรป เม็ดสีเมลานิน มีหน้าที่ในการป้องกันผิวหนังจากรังสียูวีโดยการดูดซับรังสีเอาไว้ ส่งผลให้คนผิวคล้ำซึ่งมีเม็ดสีเมลานินมากกว่าคนผิวขาวได้รับอันตรายจากรังสียูวีได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับคนผิวขาว กระบวนการสร้างเม็ดสีทั้ง 2 ชนิดนั้น เริ่มต้นจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซิน ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ให้เกิดเป็น 2,4-ไดไฮดรอกซิลฟีนิลอาลานีน (2,4-Dihydroxyphenylalanine) หรือ เอล-โดปา (L-DOPA) และจะถูกเปลี่ยนเป็นโดปาควิโนน โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดปาควิโนนที่สร้างขึ้นนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นโดปาโครม(Dopachrome) และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไลเซชันอีกหลายขั้นตอน จนได้เม็ดสี 2 ชนิด ดังภาพที่ 2-8



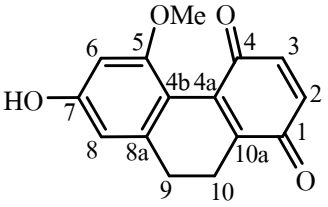
ภาพที่ 2-8 ชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (Biosynthesis of melanins) (กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, 2551)

สัดส่วนของยูเมลานินและฟีโอเมลานิน ในแต่ละคนนั้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อชาติและพันธุกรรม รวมถึงการได้รับรังสียูวีจากแสงแดด ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินเพิ่มมากขึ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินที่มากเกินไป ส่งผลต่อการเกิดฝ้า กระ จุดด่างดำของผิวหนัง ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนา จึงมีการหาวิธีการรบกวนขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ได้แก่ การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitor) สารกลุ่มนี้สามารถลดหรือยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ โดยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการใช้สารที่ทำให้ผิวหลุดลอกออกเป็นแผ่น (Exfoliation) โดยการสลายเคอร์ราตินซึ่งจะกระตุ้นการผลัดเซลล์ผิวหนังชั้นนอกให้หลุดออกได้เร็วขึ้น เซลล์ผิวใหม่ที่เกิดขึ้นจึงดูขาวใสและอ่อนกว่าวัย ในปัจจุบันผู้คนต้องการให้ผิวของตัวเองมีความขาวใส โดยการใช้สารที่ทำให้ผิวขาว ซึ่งสารทำให้ผิวขาวที่ได้รับความนิยม ได้แก่ วิตามินซี (Vitamin C) กรดโคจิก (Kojic acid) อาร์บูทิน (Arbutin) กรดอะเซลาอิก (Azelaic acid) นอกจากนี้ยังรวมถึงสารสกัดจากพืชต่าง ๆ เช่น สารสกัดจากชาเขียว ซึ่งมีสารสำคัญเป็นสารในกลุ่มแคทีชิน (Catechin) และยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย รวมถึงสารอโลซิน (Aloesin) เป็นสารที่สกัดได้จากว่านหางจระเข้ สารกลาบริดิน (Glabridin) ที่สกัดจากชะเอมเทศ โดยสารจากธรรมชาติเหล่านี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์, 2557)

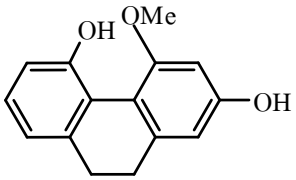
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นิตยา กันจา (2550) ศึกษาและทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกกล้วยไม้พันธุ์แท้ ในเผ่า Vandaeae Lindley จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กุหลาบมาลัยแดง (*Aeridesmultiflora* Roxb.) กุหลาบน่าน (*Aeridesrosea* Lodd. Ex Lindl. & Paxton) ไอยเรศ (*Rhynchostylisretusa* (L.) Blume) เอื้องโมก (*Papilionantheteres* (Roxb.) Lindl.) และฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl.) จากการศึกษาพบว่า ดอกกล้วยไม้ที่มีกลีบดอกอยู่ในโทนสีแดง พบแอนโทไซยานิดินชนิดไซยานินเป็นหลัก แต่กุหลาบมาลัยแดงพบไซยานิดิน (ร้อยละ 96.13) และพีลาร์โกนิดิน (ร้อยละ 3.87) และฟ้ามุ่ยพบแอนโทไซยานิดินอยู่ 2 ชนิด คือ ไซยานิดิน (ร้อยละ 52.43) และเดลฟีนิดิน (ร้อยละ 47.57) โดยสารสกัดแอนโทไซยานิดินจากกล้วยไม้ทุกพันธุ์ที่ศึกษา แสดงรูปแบบการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 320-700 นาโนเมตร ที่ไม่เหมือนกับแอนโทไซยานินที่พบได้โดยทั่วไป (Typical anthocyanins)

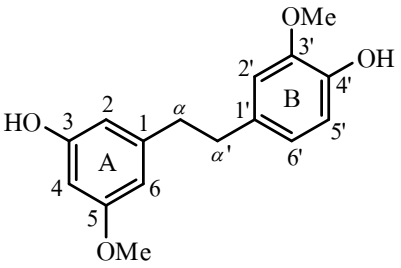
มุทิตา อนุวัฒน์ (2553) ศึกษาพฤกษเคมีของเอื้องเงิน (*Dendrobium draconis*) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ในสกุลหวายชนิดหนึ่ง ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกสารใหม่ในกลุ่มฟีแนนควิโนนได้ 1 ชนิด คือ 5-methoxy-7-hydroxy-9,10-dihydro-1,4-phenanthrenequinone และสารที่เคยมีรายงานแล้ว 5 ชนิด ได้แก่ hircinol, gigantol, batatasin III, 4-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,5,7-triol และ tristin การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้นี้อาศัยเทคนิคทางสเปคโทสโกปี เช่น MS, IR, UV และ NMR และได้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้ พบว่า 4-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,5,7-triol มีฤทธิ์ในการจับสารอนุมูลอิสระ DPPH ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Trolox



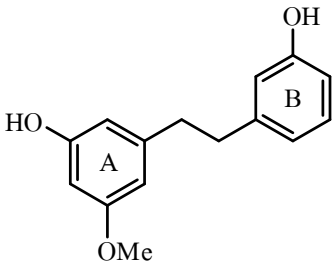
5-methoxy-7-hydroxy-9,10-dihydro-1,4-phenanthrenequinone



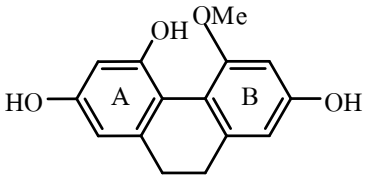
Hircinol



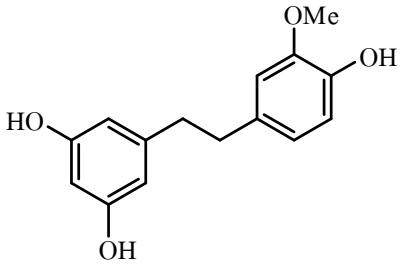
Gigantol



Batatasin III



4-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,5,7-triol



Tristin

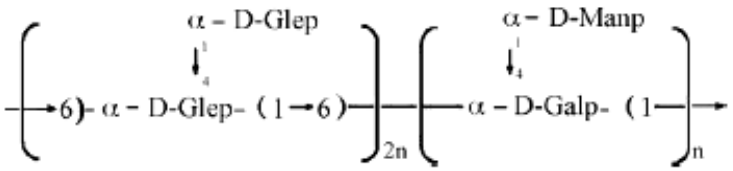
ภาพที่ 2-9 โครงสร้างของสารที่พบในเอื้องเงิน (*Dendrobium draconis*)

วรพร ศีลศร (2554) ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม และแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดกล้วยไม้สกุลหวายม่วงแดง (*Dendrobium* Sonia Red) 2 สภาวะ คือ กรด และกลาง สารสกัดหยาบที่ได้ถูกนำมาสกัดต่อด้วยเฮกเซนและเอทิล อะซิเตต ตามลำดับ พบว่าสารสกัดส่วนเอทิล อะซิเตต สภาวะที่เป็นกลาง แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ 90.39 $\pm$ 0.44 mg/100 g extract) และปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดอื่น ๆ (ร้อยละ 863.13 $\pm$ 5.11mg/100 g extract ตามลำดับ) นอกจากนี้สารสกัดส่วนน้ำ สภาวะกรดมีปริมาณแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุด (0.052 $\pm$ 0.016 µg/L)

พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์ (2557) ศึกษากลุ่มสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (TLC และ HPLC) การหาปริมาณรวมของฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2–Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical assay (DPPH assay) และ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) ของดอกไม้ไทย 10 ชนิดคือ หางนกยูง, อัญชัน, อินทนิล, คูน, แค, เข็ม, ตะแบก, บานไม่รู้โรย, เฟื่องฟ้า และกล้วยไม้ ผลจากการใช้น้ำและ 50% เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดดอกไม้พบว่าได้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ 3.33 ถึง 40.24 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่าดอกไม้ 8 ชนิด ได้แก่ อินทนิล, ตะแบก, คูน, เฟื่องฟ้า, หางนกยูง, เข็ม, แค และอัญชัน มีสารสำคัญในกลุ่มของแทนนิน, ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ ส่วนอีก 2 ชนิด คือ ดอกบานไม่รู้โรยและดอกกล้วยไม้ไม่พบสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีพบว่าสารสกัดของดอกไม้ทั้ง 10 ชนิดมีค่า Rf values แตกต่างกัน รวมทั้งการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) สามารถบ่งชี้ได้ว่าสารสกัดดอกไม้ไทยทั้ง 10 ชนิด มีสารที่ตรงกับสารมาตรฐานมากกว่า 9 ชนิดได้แก่ กรดแกลลิก, กรดคลอโรจินิก, วานิลลิน, กรดคาเฟอิก,กรดคูมาริก, คาเทชิน, กรดเฟอรูลิก, กรดวานิลลิก และกรดเอลลาจิก

Fan et al. (2009) ศึกษาการสกัด การแยก และการทำให้บริสุทธิ์ ของโพลีแซคคาไรด์จากกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium denneanum*) โดยใช้เทคนิค DEAE – cellulose และ Sephadex G – 200 column chromatography และพบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโพลีแซคคาไรด์ที่แยกได้มีค่าระหว่าง 6.95 – 51.5 kDa และ โมโนแซคคาไรด์ที่พบ คือ อะราบิโนส,ไซโลส, แมนโนส, กลูโคส และ กาแลกโทส นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพลีแซคคาไรด์ต่าง ๆ ที่แยกได้พบว่า โพลีแซคคาไรด์ DDP2-1 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เมื่อเทียบกับวิตามินซีที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

Luo et al. (2009) ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของโพลีแซคคาไรด์ (water-soluble) ที่แยกได้จากส่วนสกัดชั้นน้ำของลำต้นของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium nobile* Lindl) โดยพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้นั้นมีค่าประมาณ 8.76×10^4 Da และจากการวิเคราะห์โมโนแซคคาไรด์ของโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้นั้น จะพบน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ แรมโนส, อะราบิโนส, ไซโลส, แมนโนส, กลูโคส และ กาแลกโทส ดังภาพที่ 2-7นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพลีแซคคาไรด์ดังกล่าว พบว่ามีฤทธิ์ที่ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี



ภาพที่ 2-10 โครงสร้างหลักของ DNP จากกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium nobile* Lindl)

Shafazila, Pat and Lee (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การหาปริมาณฟีนอลิกรวม และการหาปริมาณแอนโทไซยานินรวมของส่วนสกัดชั้นต่าง ๆ ของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Sonia 'Red Bom') พบว่าในส่วนสกัดชั้นน้ำ (water layer) พบปริมาณของแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุด นอกจากนี้ส่วนสกัดชั้นน้ำยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดอีกด้วย โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging เมื่อเทียบกับวิตามินซีที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

Taketsugu et al. (2010) ศึกษาประสิทธิของเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากพืชที่อุดมไปด้วยสารสกัดจากกล้วยไม้ เปรียบเทียบกับ 3% ของอนุพันธ์วิตามินซีในกลุ่มอาสาสมัครผู้หญิงของประเทศญี่ปุ่น โดยประเมินผลทางคลินิกจากแพทย์ผิวหนังและการ สำรวจความพึงพอใจของผู้ใช้ พบว่าเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากกล้วยไม้มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงด้านความสว่าง ความเข้มของสี จุดด่างดำ และความกระจ่างใสของใบหน้าใกล้เคียงกับอนุพันธ์ของวิตามินซี

Johnson and Janakiraman (2013) ศึกษาพฤกษทางเคมีของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium panduratum* subsp. *villosum* Gopalan & A. N. Henry) จากส่วนสกัดหยาบชั้นน้ำ, เบนซีน, เอทานอล, อะซีโตน และปิโตเลียมอีเทอร์ ของใบและลำต้น ผลการตรวจสอบพฤกษเคมีพบว่า สารสกัดส่วนลำต้นและใบของกล้วยไม้ชนิดนี้มีสารในกลุ่มสเตอรอยด์, ไตรเทอร์พีนอยด์, อัลคาลอยด์, แทนนิน, ฟีนอล และฟลาโวนอยด์ ดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ผลการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของใบและลำต้นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium panduratum* subsp. *villosum* Gopalan & A. N. Henry)

สารพฤกษเคมี	ใบ					ลำต้น				
	A	B	PE	E	Aq	A	B	PE	E	Aq
Steroids	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Triterpenoids	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Alkaloids	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
Saponins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tannins	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Anthraquinone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenols	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Flavonoids	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Catechin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ 1. A: Acetone, B: Benzene, PE: Petroleum Ether, E: Ethanol, Aq: Aqueous

2. + พบ, - ไม่พบ

Prajapati and Patel (2013) ได้ศึกษาพฤกษทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากรากของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium macraei*) พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอลของราก มีสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต, คูมาริน, อัลคาลอยด์, ไฟโทสเตอรอยด์, ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก เป็นส่วนประกอบ ดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 ผลการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของรากกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium macraei*)

ลำดับที่	สารพฤกษเคมี	ผลการทดสอบ
1	Carbohydrates	+
2	Proteins and amino acids	-
3	Glycosides	-
4	Anthraquinone Glycosides	-
5	Saponin Glycosides	-
6	Steroids	+
7	Coumarins	+
8	Flavonoids	+
9	Tannins	-
10	Phenolics	+
11	Alkaloids	+

หมายเหตุ + พบ, - ไม่พบ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

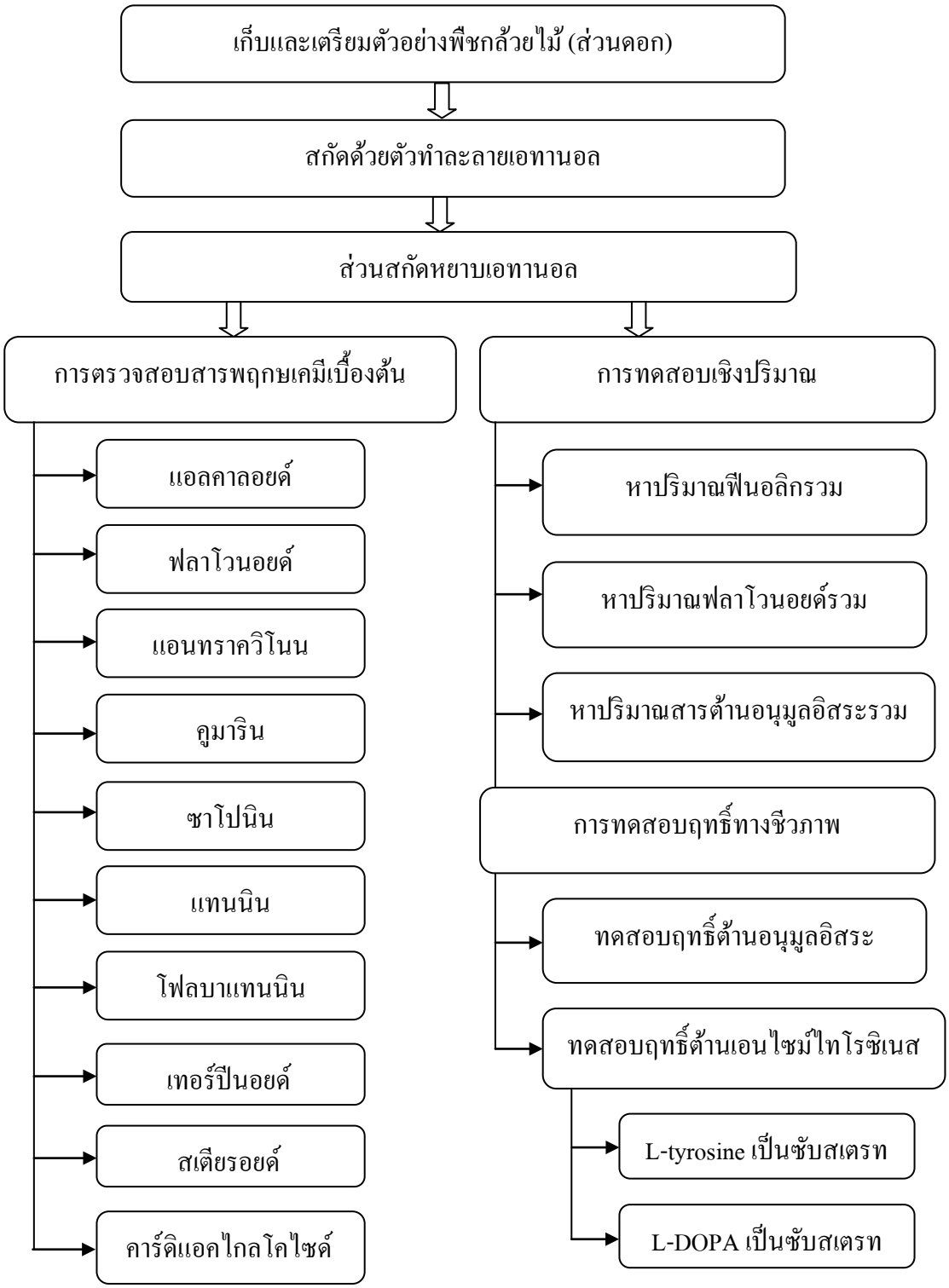
1. เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary evaporator) บริษัท Buchi รุ่น R-3
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler รุ่น AE200
3. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer บริษัท Thermo Scientific รุ่น Genesys 20
4. เครื่องอังน้ำ (Water bath) บริษัท Heto DT Hetrotherm
5. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) บริษัท Wisemix รุ่น VM-10
6. เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micropipette) บริษัท eppendorf
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate Reader) บริษัท Biotek รุ่น EPOCH-2 microplate reader
8. เครื่องเขย่า 96 well plate บริษัท Oragon Lab รุ่น MX-M
9. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) บริษัท Mettler toledo
10. จานหลุม (96-well plate)
11. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
12. บีกเกอร์ (Beaker)
13. กระบอกตวง (Graduates Cylinder)
14. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
15. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
16. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
17. ขวดบรรจุสารขนาดเล็ก (vial)

3.1.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น (Distilled water)
2. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH)
3. เมทานอล (Methanol, CH_3OH)
4. คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$)
5. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4)

6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
7. กรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH)
8. แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3)
9. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) No.A463-500 G, Univar
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) No.480507, Carlo erba
11. โซเดียมฟอสเฟต (Sodium phosphate tribasic dodecahydrate, $Na_3PO_4.12H_2O$) No. 10101-89-0, Sigma-Aldrich
12. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมอโนไฮเดรต (Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate, $NaH_2PO_4.H_2O$) No.10049-21-5, Merck
13. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Di-Sodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4) No. 7558-79-4, Merck
14. เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$) No.803945, Merck-Schuchardt
15. อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (Aluminium trichloride, $AlCl_3$) No.801081, Merck-Schuchardt
16. แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) No.0716-01, Baker Analyzed
17. ลวดแมกนีเซียม (Mg ribbon)
18. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) No.43180, Fluka
19. กรดแกลลิก (Gallic acid) No.48630, Fluka
20. วิตามินซี (Ascorbic acid) No.1.00127.0100, Merck
21. เคอร์ซิติน (Quercetin) No.33795-1, Aldrich
22. กรดโคจิก (Kojic acid) No.K3125, Sigma-Aldrich
23. น้ำยาทดสอบดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent)
24. น้ำยาทดสอบฟอลินซิโอแคลตู (Folin-Ciocalteu reagent) No.463562, Carlo erba
25. เอ็นไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) No.T3824-50KU, Sigma-Aldrich, Tyrosinase from mushroom
26. L-Tyrosine No.488152, Carlo Erba
27. L-DOPA No.37830, Fluka

3.2 แผนการดำเนินการวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล (กลีบดอกสีม่วงเข้ม) สายพันธุ์เจสซิก้า (กลีบดอกสีม่วงอ่อน) สายพันธุ์บูรณะเจต (กลีบดอกสีเหลืองอมเขียว ปากสีม่วง) และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น (กลีบดอกสีขาว ปากสีเหลือง) เก็บมาจากสวนกล้วยไม้บูรณะออร์คิด ตำบลนครชัยศรี อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ในช่วงเดือนมีนาคม 2557

3.3.2 วิธีการสกัดสารสกัดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

1. นำดอกสดของกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด เฉพาะส่วนดอก มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยทำการแยกบดกล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์ และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำดอกกล้วยไม้สดแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 1 สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3. นำสารละลายของส่วนสกัดจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละสายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มากรองผ่านสำลี

4. นำสารละลายของส่วนสกัดจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

5. นำสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลที่สกัดได้ไปตรวจสอบสารทางพฤกษเคมี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.3.3 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 สายพันธุ์ แบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอร์รอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008; Sazada et al., 2009; Shyam-Krishnan et al., 2013) ดังนี้

1. การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลาย

เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

2. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3. การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

4. การตรวจสอบคูมาริน (Coumarin)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบคูมาริน

5. การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

6. การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่อง อังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

7. การตรวจสอบโฟลบาแทนนิน (Phlobatannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (10% HCl) จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบโฟลบาแทนนิน

8. การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

9. การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียรอยด์

10. การตรวจสอบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

3.3.4 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic, Skerget and Knez (2007) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารประกอบฟีนอลิกรวมจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวมเกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1–0.0001 mg/ml) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตรให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจาก

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mg GAE/g dried extract)

3.3.5 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat and Legret (1994) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐานมีหลักการคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจะใช้ Phenolic hydroxyl groups ทำปฏิกิริยากับ $AlCl_3$ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (ความเข้มข้น 0.1–0.0001 mg/ml) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิตินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mg QE/g dried extract)

3.3.6 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity)

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Prieto, Pineda and Aguilar (1999) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือสารต้านอนุมูลอิสระรวมจะทำปฏิกิริยากับ Phosphomolybdate reagent สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของสารต้านอนุมูลอิสระรวมเกิดเป็น Molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (ความเข้มข้น 0.5–0.01 mg/ml) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Phosphomolybdate reagent ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มบนเครื่องอังน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 78°C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานวิตามินซีในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Ascorbic acid equivalents, mg AE/g dried extract)

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli and Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐานมีหลักการคือ สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) จะเป็นสารละลายสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 mg/ml) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 mg/ml) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตรให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH radical inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ
B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda and Yonemori (2005) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐานมีหลักการคือ เอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยน L-Tyrosine ไปเป็น L-DOPA และ L-DOPA เปลี่ยนไปเป็นสารที่มีสีน้ำตาลเรียกว่า Dopachrome และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 mg/ml) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 mg/ml) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย Sodium phosphate buffer (pH 6.8) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 800 U/mL (สำหรับ L-tyrosine), 400 U/mL (สำหรับ L-DOPA) ใน Sodium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลง

ในจานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-Tyrosine หรือ L-DOPA ปริมาตร 40 μL ลงในแต่ละหลุมเขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) จากสูตร

$$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

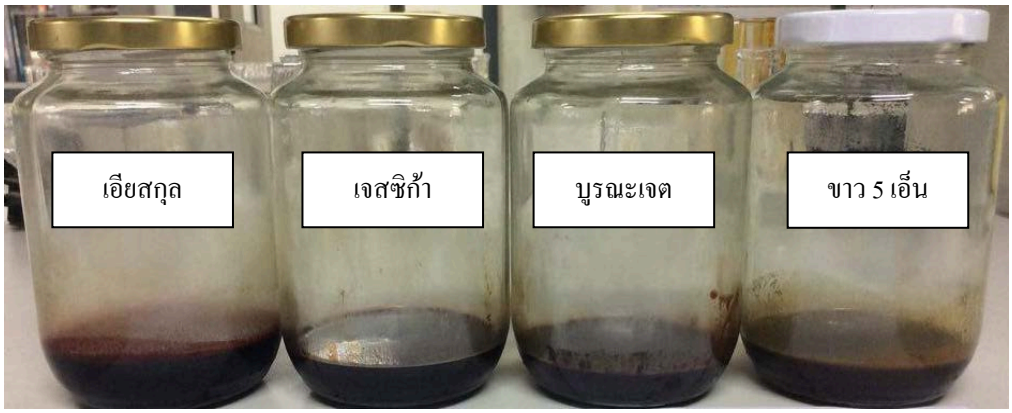
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 การสกัดสารสกัดดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

จากการสกัดส่วนดอกของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น โดยการแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และเมื่อทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน จะได้เป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่มีน้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต (%Yield) และลักษณะต่าง ๆ ทางกายภาพ ดังตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพ

สารสกัดส่วนเอทานอลของดอกกล้วยไม้	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต	ลักษณะของสารสกัดที่ได้
เอียสกุล	104.09	3.50	ของเหลวข้นหนืดสีม่วงเข้ม
เจสซิก้า	80.03	3.23	ของเหลวข้นหนืดสีชมพูเข้ม
บูรณะเจต	71.75	3.33	ของเหลวข้นหนืดสีแดงเข้ม
ขาว 5 เอ็น	105.29	6.50	ของเหลวข้นหนืดสีเหลืองเข้ม



ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008; Sazada et al., 2009; Shyam-Krishnan et al., 2013) ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ได้ผลดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด

สารพฤกษเคมี	สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ต่าง ๆ			
	เอียสกุล	เจสซิก้า	บูรณะเจต	ขาว 5 เอ็น
แอนทราควิโนน	-	-	-	-
เทอร์พีนอยด์	+++	+++	+++	+++
ฟลาโวนอยด์	+++	+++	+	++
ซาโปนิน	-	-	-	-
แทนนิน	+++	++	++	+++
แอลคาลอยด์	-	-	-	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	+	+	++	+++
โพรบาแทนนิน	-	-	-	-
สเตียรอยด์	++	+++	+++	+++
คูมาริน	+	+++	+++	+++

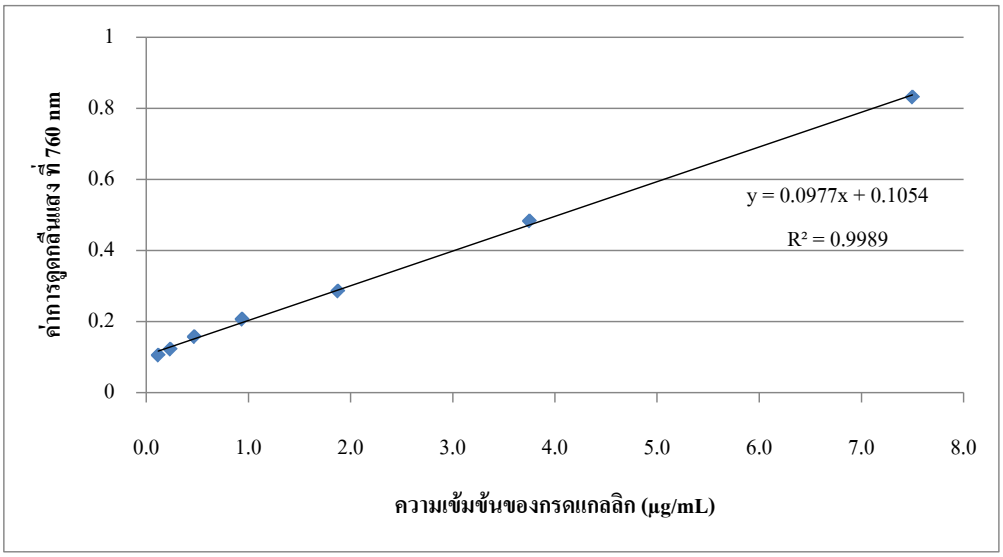
หมายเหตุ
- หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ
+ หมายถึง ตรวจสอบพบน้อย
++ หมายถึง ตรวจสอบพบปานกลาง
+++ หมายถึง ตรวจสอบพบมาก

จากการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด พบสารพฤกษเคมีที่เหมือนกัน 6 ชนิด คือ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ สเตียรอยด์ และคูมาริน แต่บางสายพันธุ์อาจจะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันออกไป อาทิเช่น สายพันธุ์เอียสกุล (กลีบดอกสีม่วงเข้ม) และสายพันธุ์เจสซิก้า (กลีบดอกสีม่วงอ่อน)

จะตรวจสอบพบฟลาโวนอยด์มากกว่าสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น (กลีบดอกสีขาว ปากสีเหลือง) และสายพันธุ์บูรณะเจต (กลีบดอกสีเหลืองอมเขียว ปากสีม่วง) ตามลำดับ แทนนินจะตรวจสอบพบมากในสายพันธุ์เอียสกุล และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มากกว่าสายพันธุ์เจสซิก้าและสายพันธุ์บูรณะเจต ส่วนคาร์ดิแอกไกลโคไซด์จะตรวจสอบพบมากในสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น รองลงมาเป็นสายพันธุ์บูรณะเจต และตรวจสอบพบเท่ากันในสายพันธุ์เอียสกุล และสายพันธุ์เจสซิก้า ในขณะที่สเตียรอยด์และคูมารินจะตรวจสอบพบมากใน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น และตรวจสอบพบน้อยในสายพันธุ์เอียสกุล ส่วนแอนทราควิโนน ซาโปนิน แอลคาลอยด์ โพรบา-แทนนิน ตรวจไม่พบในสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

4.3 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

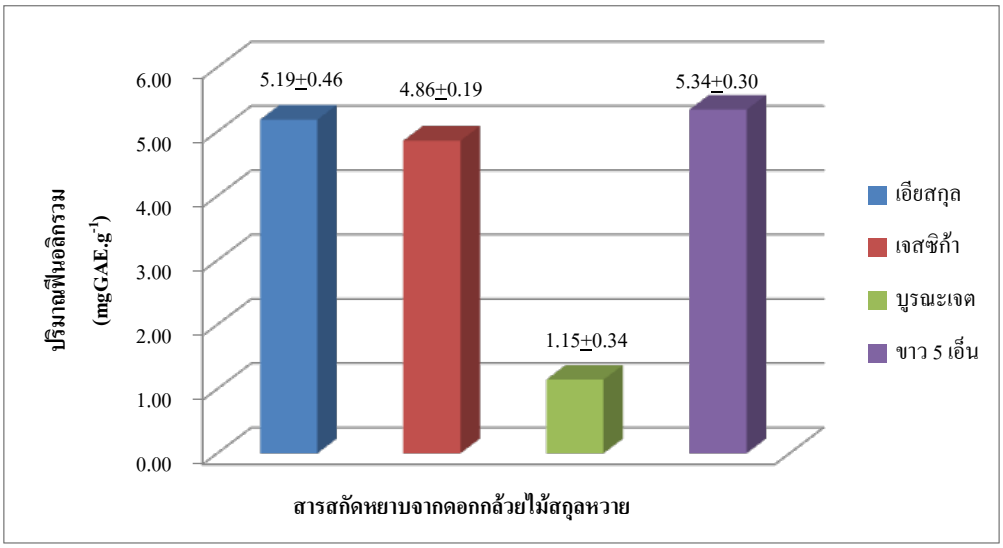
การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic, Skerget and Knez (2007) ซึ่งใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ดังภาพที่ 4-2 ($y = 0.0977x + 0.1054$, $R^2 = 0.9989$)



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid)

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.0977x + 0.1054$) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์

เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ได้ผลดังภาพที่ 4-3 โดยรายงานในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (mgGAE.g^{-1})

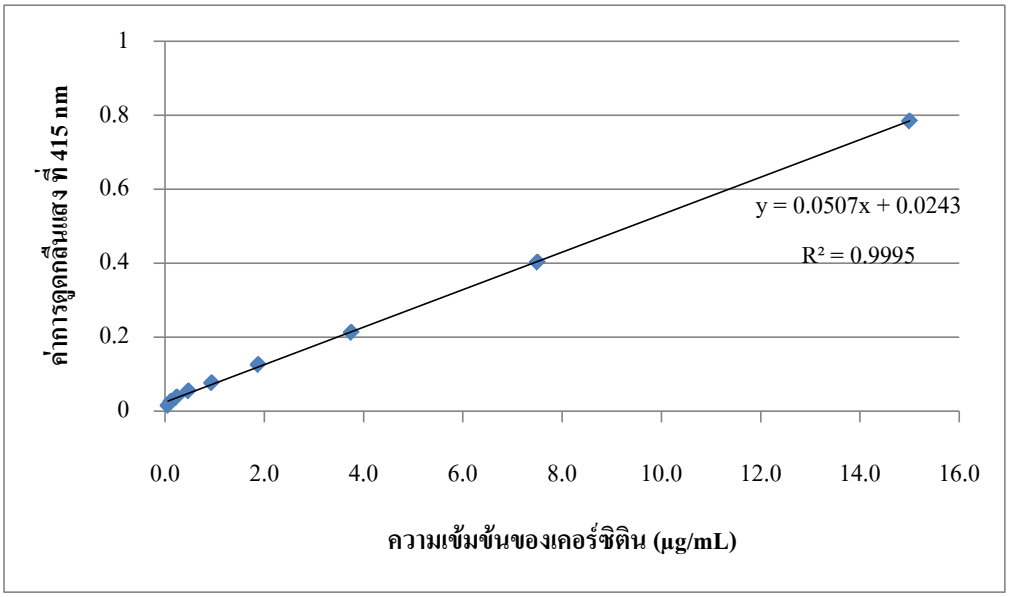


ภาพที่ 4-3 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

จากผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (5.34±0.30 mgGAE.g^{-1}) รองลงมาได้แก่ สายพันธุ์เอียสกุล (5.19±0.46 mgGAE.g^{-1}) สายพันธุ์เจสซิก้า (4.86±0.19 mgGAE.g^{-1}) และสายพันธุ์บูรณะเจต (1.15±0.34 mgGAE.g^{-1}) ตามลำดับ

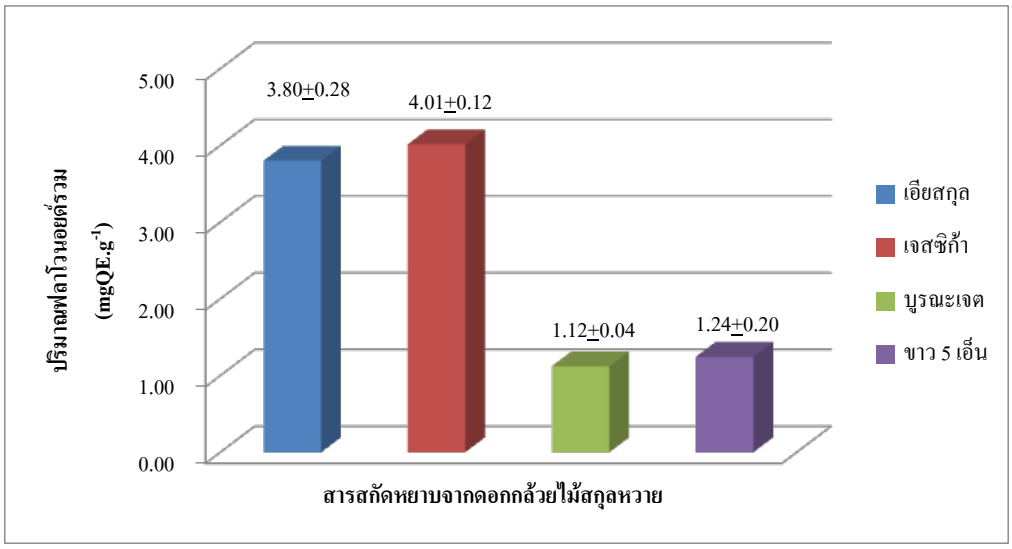
4.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content: TFC) โดยใช้วิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat และ Legret (1994) ซึ่งใช้เคอร์ซิติน (Qurecetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานสารละลายเคอร์ซิติน ดังภาพที่ 4-4 ($y = 0.0507x + 0.0243$, $R^2 = 0.9995$)



ภาพที่ 4-4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซิติน (Quercetin)

จากกราฟมาตรฐานสารละลายเคอร์ซิติน (y = 0.0507x + 0.0243) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ได้ผลดังภาพที่ 4-5 โดยรายงานในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม ($mgQE.g^{-1}$)

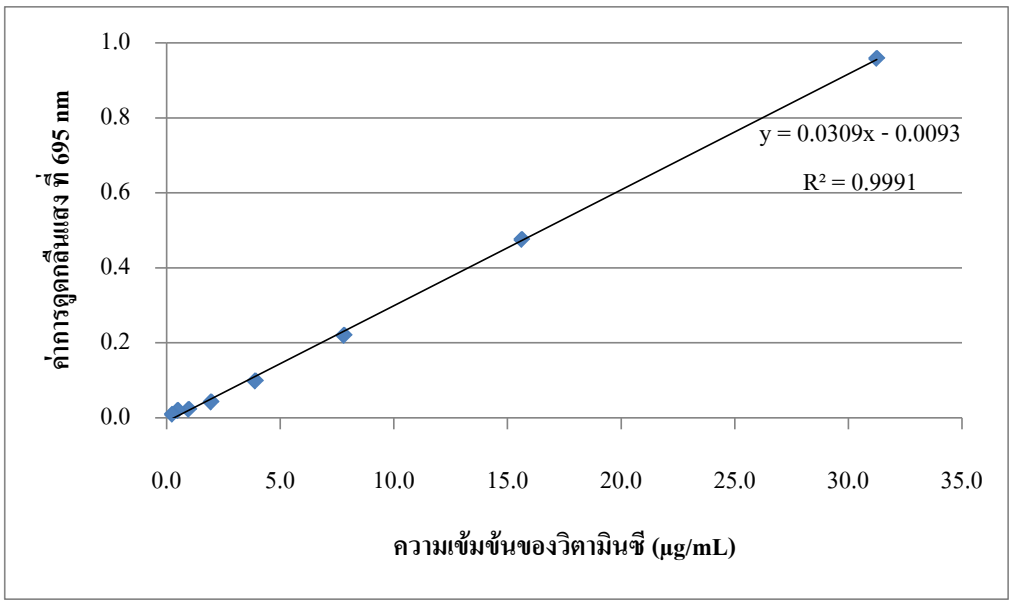


ภาพที่ 4-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

จากผลการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สายพันธุ์เจสซิก้า ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (4.01 ± 0.12 mgQE.g^{-1}) รองลงมาได้แก่ สายพันธุ์เอียสกุล (3.08 ± 0.28 mgQE.g^{-1}) สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น (1.24 ± 0.20 mgQE.g^{-1}) และสายพันธุ์บูรณะเจต (1.12 ± 0.04 mgQE.g^{-1}) ตามลำดับ

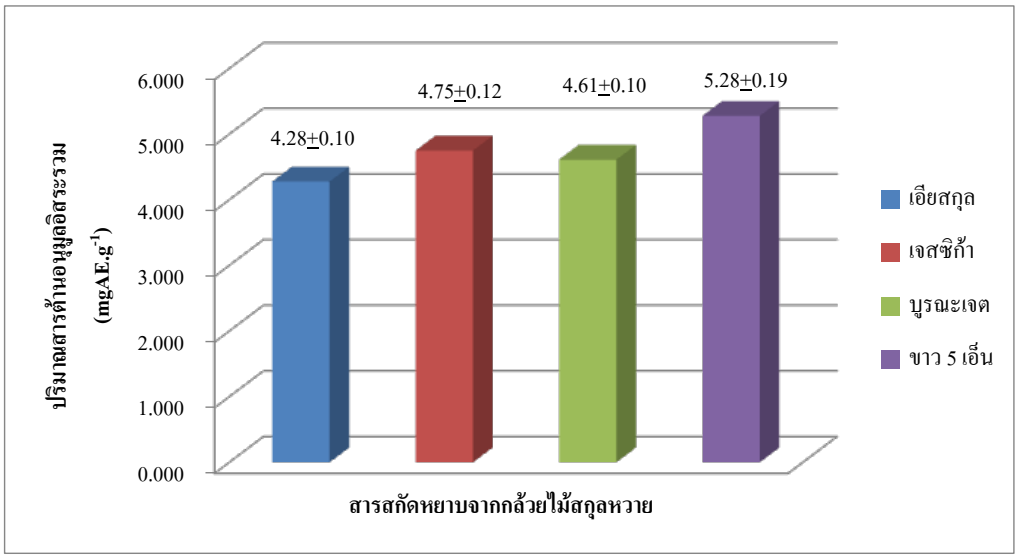
4.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity: TAC) โดยใช้วิธี Phosphomolybdate colorimetric

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Prieto, Pineda and Aguilar (1999) ซึ่งใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี ดังภาพที่ 4-6 ($y = 0.0309x - 0.0093$, $R^2 = 0.9991$)



ภาพที่ 4-6 กราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินซี (L-ascorbic acid)

จากกราฟมาตรฐานสารละลายวิตามินซี (y = 0.0309x - 0.0093) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ได้ผลดังภาพที่ 4-7 โดยรายงานในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม ($mgAE.g^{-1}$)



ภาพที่ 4-7 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

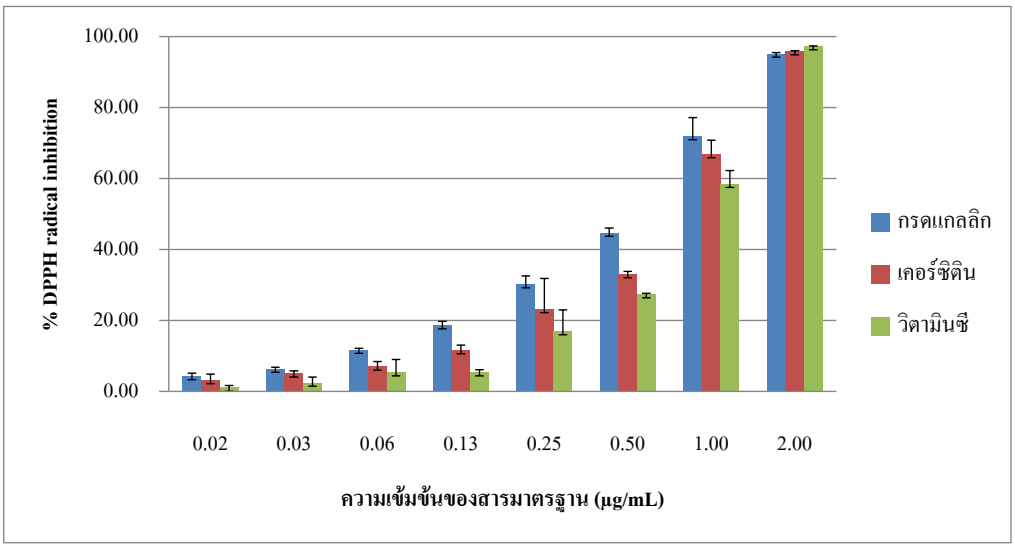
จากผลการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมสูงที่สุด (5.28±0.19 mgAE.g^{-1}) รองลงมาได้แก่ สายพันธุ์เจสซิก้า (4.75±0.12 mgAE.g^{-1} สายพันธุ์บูรณะเจต (4.61±0.10 mgAE.g^{-1}) และสายพันธุ์เอียสกุล (4.28±0.10 mgAE.g^{-1}) ตามลำดับ

4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Braca, Sortino, Politi, Morelli and Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 µg/mL ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ดังแสดงในตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-8

ตารางที่ 4-3 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ของสารมาตรฐาน กรดแกลลิก, เคอร์ซิติน และวิตามินซี

ความเข้มข้น (µg/mL)	% DPPH radical inhibition		
	กรดแกลลิก	เคอร์ซิติน	วิตามินซี
0.02	4.29±0.86	2.97±1.66	1.11±0.63
0.03	6.36±0.41	5.28±0.73	2.45±1.59
0.06	11.69±0.42	6.99±1.40	5.38±3.61
0.13	18.57±1.13	11.60±1.42	5.36±0.73
0.25	30.19±2.33	23.13±8.67	16.90±6.05
0.50	44.70±1.33	33.01±0.82	27.33±0.29
1.00	71.95±5.18	66.83±3.98	58.50±3.75
2.00	95.19±0.30	95.84±0.13	97.25±0.11

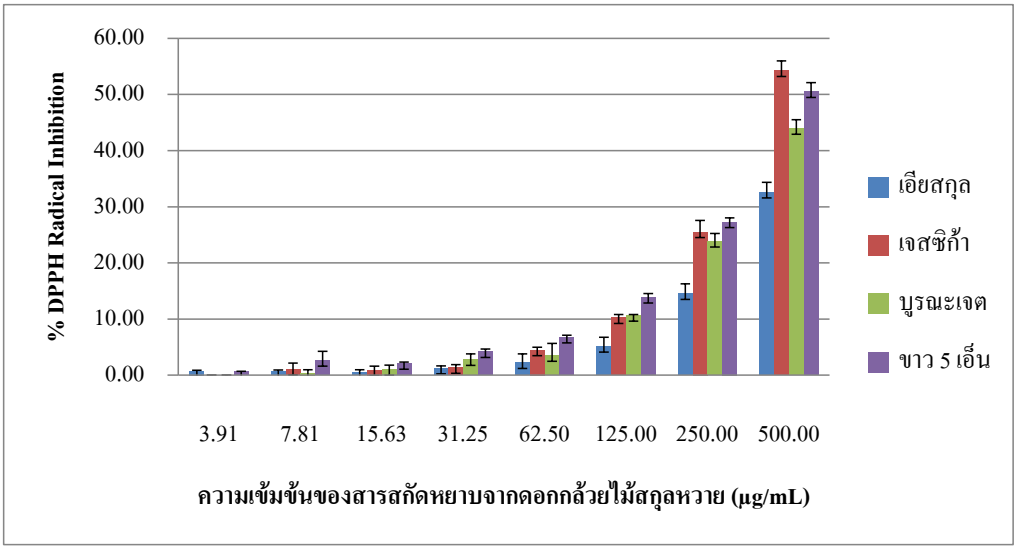


ภาพที่ 4-8 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ของสารมาตรฐาน กรดแกลลิก เคอร์ซิติน และวิตามินซี

หลังจากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกัน โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 µg/mL ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-9

ตารางที่ 4-4 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

ความเข้มข้น (µg/ml)	**% DPPH radical inhibition**			
	เอียสกุล	**เจสซิก้า**	**บูรณะเจต**	**ขาว 5 เอ็น**
3.91	0.72±0.15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.71±0.00
7.81	0.62±0.29	1.04±1.15	0.36±0.62	2.59±1.63
15.63	0.48±0.48	0.93±0.66	0.95±0.82	2.04±0.27
31.25	1.24±0.41	1.32±0.58	2.74±1.03	4.17±0.49
62.50	2.20±1.60	4.49±0.48	3.45±2.18	6.76±0.36
125.00	5.09±1.67	10.21±0.61	10.60±0.21	13.84±0.72
250.00	14.50±1.75	25.52±2.02	23.81±1.44	27.28±0.72
500.00	32.58±1.79	54.22±1.77	43.93±1.56	50.47±1.65



ภาพที่ 4-9 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

จากภาพที่ 4-9 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้เพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 250 µg/mL สารสกัดหยาบจากกล้วยไม้สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น สามารถแสดงค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (27.28%) รองลงมาเป็นสายพันธุ์เจสซิก้า (25.52%), สายพันธุ์บูรณะเจต (23.81%) และสายพันธุ์เอียสกุล (14.50%) ตามลำดับ

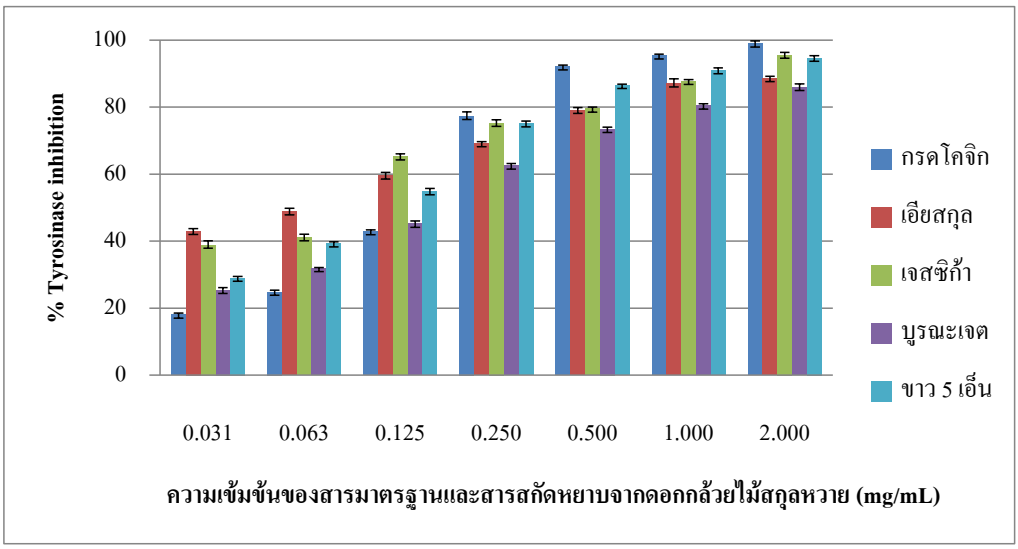
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น พบว่า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ที่ดีที่สุด รองลงมาเป็นสายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์เอียสกุล ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม แสดงว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) โดยสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ในการรีดิวซ์ Mo (VI) เป็น Mo (V) และรีดิวซ์ $DPPH^{\cdot}$ เป็น DPPH:H ได้ดีที่สุด

4.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay) โดยมี L-tyrosine เป็นซับสเตรท

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda and Yonemori (2005) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน มี L-tyrosine เป็นซับสเตรท และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2.00 mg/mL ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-10

ตารางที่ 4-5 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-tyrosine เป็นซับสเตรท

ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition)				
	กรดโคจิก	เอียสกุล	เจสซิก้า	บูรณะเจต	ขาว 5 เอ็น
0.03	18.03±0.47	43.02±0.74	38.87±1.24	25.41±0.74	29.01±0.46
0.06	24.86±0.47	48.80±1.00	41.07±0.98	31.88±0.28	39.24±0.53
0.13	42.90±0.47	59.55±0.96	65.20±0.81	45.15±0.84	54.81±0.95
0.25	77.32±1.25	69.18±0.48	75.24±0.98	62.46±0.74	75.12±0.70
0.05	92.08±0.47	79.13±0.74	79.47±0.54	73.46±0.56	86.57±0.26
1.00	95.36±0.47	87.00±1.44	87.77±0.47	80.42±0.56	90.99±0.70
2.00	98.91±0.82	88.60±0.56	95.61±0.72	85.92±0.97	94.66±0.70



ภาพที่ 4-10 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-tyrosine เป็นซับสเตรท

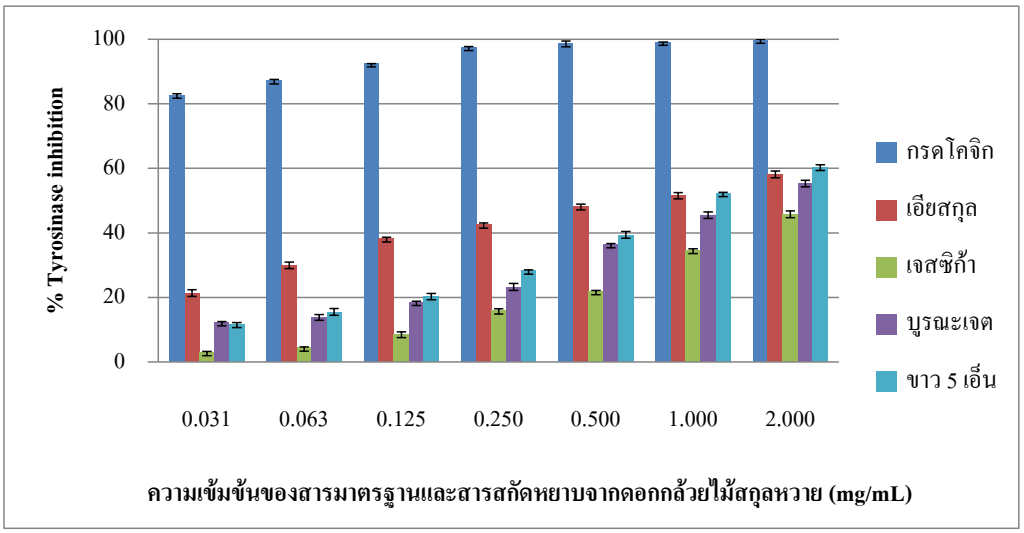
จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยใช้กรดโคจิกเป็นสารมาตรฐานมี L-Tyrosine เป็นซับสเตรท พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (90.99%) รองลงมาคือ สายพันธุ์เจสซิก้า (87.77%) สายพันธุ์เอียสกุล (87.00%) และสายพันธุ์บูรณะเจต (80.42%) ตามลำดับ และพบว่าค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสายพันธุ์ขาว 5 เอ็นมีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดโคจิก (95.36%)

4.8 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay) โดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda and Yonemori (2005) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน มี L-DOPA เป็นซับสเตรท และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2.00 mg/mL ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ดังแสดงในตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-11

ตารางที่ 4-6 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท

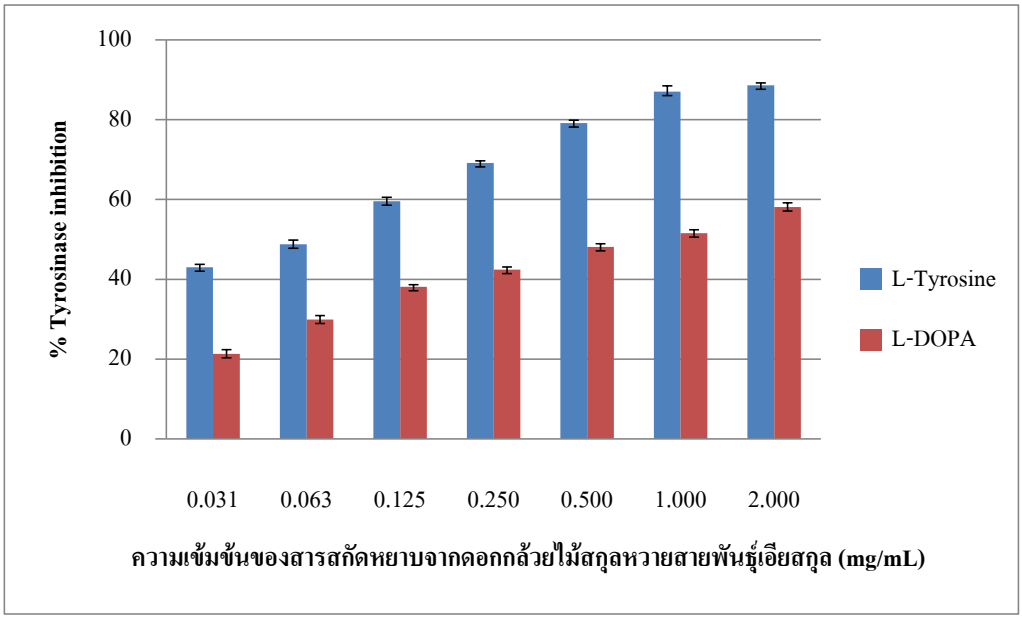
ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition)				
	กรดโคจิก	เอียสกุล	เจสซิก้า	บูรณะเจต	ขาว 5 เอ็น
0.03	82.67±0.44	21.31±1.07	2.97±0.30	12.18±0.30	11.67±0.54
0.06	87.11±0.44	29.90±1.03	4.36±0.30	13.89±0.79	15.44±1.08
0.13	92.44±0.00	38.14±0.52	8.55±0.80	18.53±0.30	20.29±0.93
0.25	97.48±0.26	42.44±0.60	15.88±0.60	23.16±1.19	28.19±0.31
0.05	98.67±0.77	48.11±0.79	21.82±0.30	36.36±0.30	39.32±1.12
1.00	99.11±0.00	51.55±0.89	34.56±0.52	45.46±1.03	52.24±0.31
2.00	99.70±0.26	58.08±1.07	45.72±1.09	55.23±1.03	60.32±0.82



ภาพที่ 4-11 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท

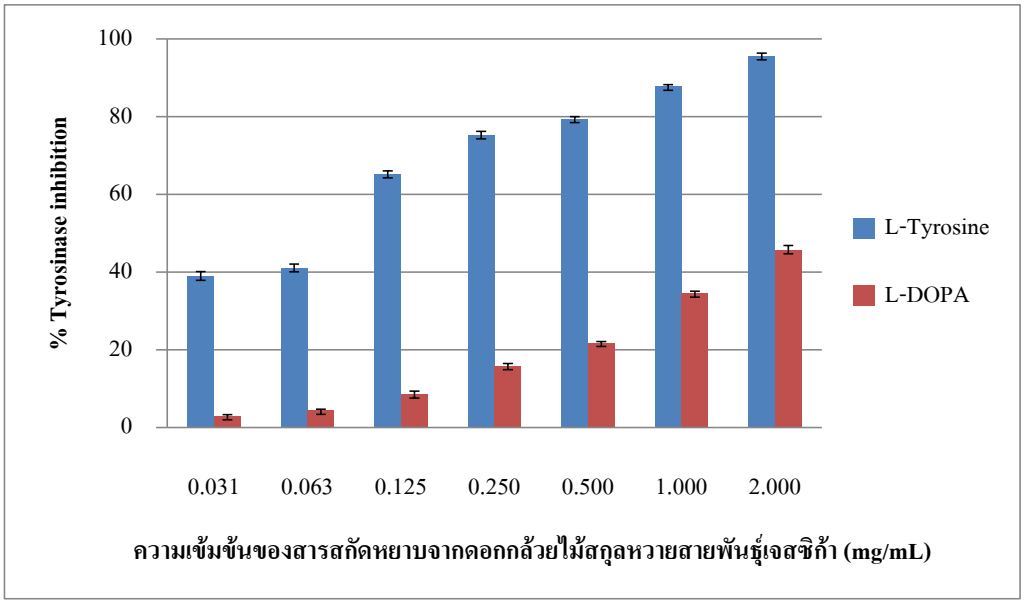
จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐานและมี L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (52.24%) รองลงมาคือ สายพันธุ์เอียสกุล (51.55%) สายพันธุ์บูรณะเจต (45.46%) และสายพันธุ์เจสซิก้า (34.56%) ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดดังกล่าวยังคงมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก (99.11%)

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมี L-tyrosine กับ L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ที่มี L-tyrosine เป็นซับสเตรท มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าซับสเตรทที่เป็น L-DOPA ในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4-12)



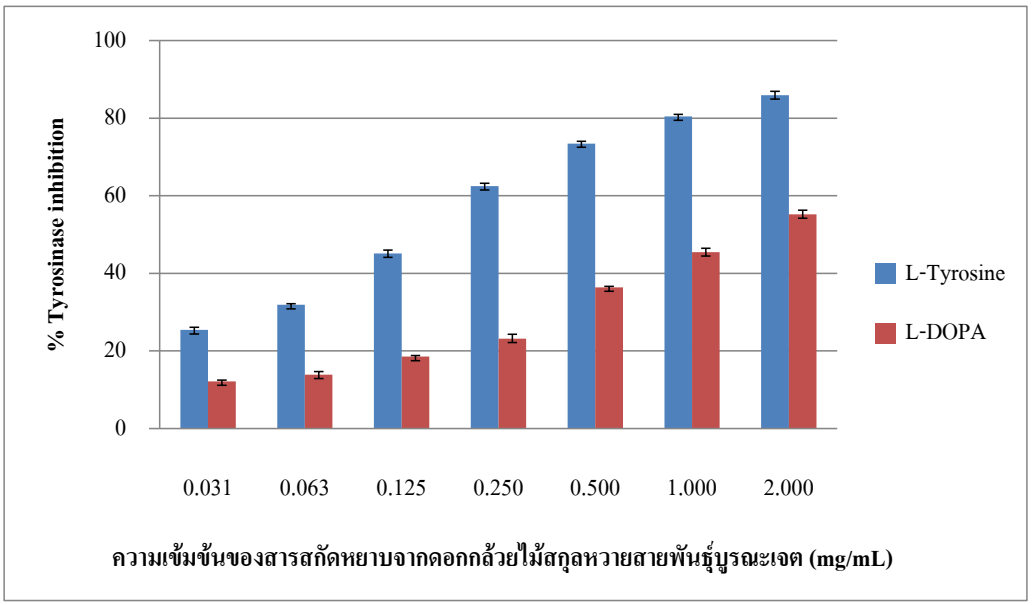
ภาพที่ 4-12 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-Tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล *Dendrobium* spp. 'Sonia Earsakul'

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมี L-Tyrosine กับ L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เจสซิก้า ที่มี L-tyrosine เป็นซับสเตรท มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าซับสเตรทที่เป็น L-DOPA ในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4-13)



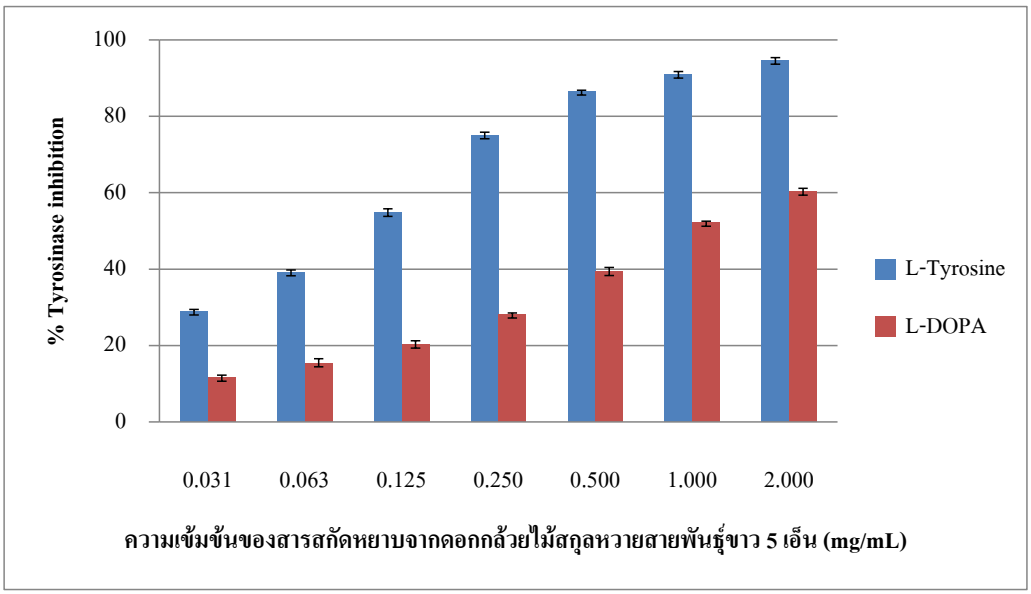
ภาพที่ 4-13 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-Tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เจสซิก้า *Dendrobium* spp. Jessica

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมี L-Tyrosine กับ L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บูรณะเจต ที่มี L-tyrosine เป็นซับสเตรท มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าซับสเตรทที่เป็น L-DOPA ในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4-14)



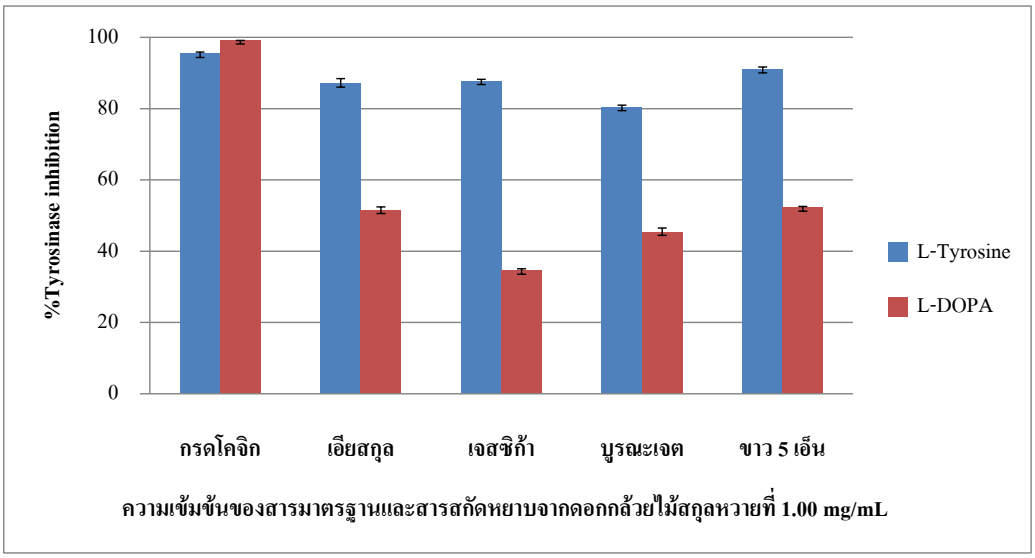
ภาพที่ 4-14 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-Tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บูรณะเจต *Dendrobium* spp. Burana Jade

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมี L-Tyrosine กับ L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ที่มี L-tyrosine เป็นซับสเตรท มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าซับสเตรทที่เป็น L-DOPA ในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4-15)



ภาพที่ 4-15 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-Tyrosine และ L-DOPA ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น *Dendrobium* spp. White Fairy

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีซับสเตรทเป็น L-Tyrosine กับ L-DOPA พบว่าสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL (90.99% และ 52.24% ตามลำดับ) และพบว่าค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสายพันธุ์ขาว 5 เอ็นมีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดโคจิก (95.36%) ที่มี L-Tyrosine เป็นซับสเตรท



ภาพที่ 4-16 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) โดยมีซับสเตรทเป็น L-Tyrosine และ L-DOPA ของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL

จากการศึกษาสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด ที่มีซับสเตรทเป็น L-tyrosine และ L-DOPA ผลดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวมที่พบสูงที่สุดเช่นเดียวกัน (5.34 ± 0.30 $mgGAE.g^{-1}$) นอกจากนี้ยังพบว่า ผลของสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น สอดคล้องกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (5.28 ± 0.19 $mgAE.g^{-1}$) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (27.28%) ซึ่งผลดังกล่าว พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างเม็ดสี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นั้น น่าจะเป็นผลมาจากสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งให้ผลตรงกับสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบของสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น คือสารในกลุ่มของฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และคูมาริน

ดังนั้นดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นสายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์เอียสกุล และสายพันธุ์บูรณะเจต ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ในการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด พบสารพฤกษเคมี 6 ชนิด คือ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน คาร์ดิแอก-ไกลโคไซด์ สเตียรอยด์ และคูมาริน และนำสารสกัดดังกล่าวไปศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม (1.15±0.34 ถึง 5.34±0.30 mgGAE/g) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (1.12±0.04 ถึง 4.01±0.12 mgQE/g) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (4.28±0.10 ถึง 5.28±0.19 mgAE/g) รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่า สายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (27.28%) รองลงมาคือ สายพันธุ์เจสซิก้า (25.52%) สายพันธุ์บูรณะเจต (23.81%) และสายพันธุ์เอียสกุล (14.50%) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสี โดยมี L-tyrosine และ L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่า ดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดทั้ง 2 ซับสเตรท (90.99% และ 52.24% ตามลำดับ) และในการทดสอบที่ใช้ L-tyrosine เป็นซับสเตรท ดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น ยังคงมีฤทธิ์ดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐานกรดโคจิกอีกด้วย จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างเม็ดสี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นั้น น่าจะเป็นผลมาจากสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งให้ผลตรงกับสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบของสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น คือสารในกลุ่มของฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และคูมาริน

ดังนั้นดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นสายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์เอียสกุล และสายพันธุ์บูรณะเจต ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาสารสกัดตัวอย่างดอกกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ตัวอย่างแห้ง เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับดอกกล้วยไม้ที่เหลือจากการใช้ประโยชน์แล้ว

2. ควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านเครื่องสำอางต่อไป เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดสิว ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

3. ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสี หากต้องการนำไปพัฒนาเป็นองค์ประกอบภายในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ควรทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity) เพิ่มเติม

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. (2548). *กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าในประเทศไทย.* กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2551). *คู่มือนักวิชาการส่งเสริมการเกษตร กล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวาย.* กรุงเทพฯ: สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. (2555). *กล้วยไม้ เทคโนโลยีและการประยุกต์ใช้งาน*. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ. (2551). *มะหาด ประโยชน์ทางยา เครื่องสำอาง และการเกษตร*. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จุฑารัตน์ ทวีกิจโภไคย. (2554). *การหาปริมาณฟลาโวนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชตระกูลเฟินโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับอัลตราโซนิค*. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). *เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

นิตยา กันจา. (2550). *การศึกษาชนิด คุณสมบัติและความเสถียรของแอนโทไซยานินของดอกกล้วยไม้พันธุ์แท้ 5 สายพันธุ์ในเผ่า VANDEAE Lindley*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์. (2557). *ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดดอกไม้ไทย: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -2 และ -9 และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มาลินี อินทร์วงศ์. (2553). *ความสามารถในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้สกุลหวายของไทยและหวายพันธุ์การค้า*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชสวน, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มุทิตา อนุวัฒน์. (2553). *สารต้านอนุมูลอิสระจากเอื้องเงิน*. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชเวท, คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย และประพนธ์ วิไลรัตน์. (2538). Apoptosis : กลไกกับการประยุกต์ใช้ทางคลินิค. *วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *3* (1-2), 11-16.

วรพร ศีลศร. (2554). *การเตรียมสารสกัดมาตรฐานกล้วยไม้หวายม่วงแดงเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาส นิยมไทย. (2556). การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 41*, 723–730.

สุกัญญา จันทกุล, อารยะ ไทยเที่ยง และศักรินทร์ หงส์รัตนาวรกิจ. (2556). *การศึกษาวิธีการเก็บรักษามาลัยกล้วยไม้สด*. ทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้, คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

อุดมเดชา พลเยี่ยม. (2556). *การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ*. ทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardisation d' un extrait de propolis et indentification des principaux constituants. *J. de Phamacie de Belgique, 49,* 462-468.

Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., & Atangbayila, T.O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *7*, 1019–1024.

Braca, A., Sortino, C., Politi, M. Morelli, I., & Mendez, J. (2002). Antioxidant activity of Flavonoids from Licania licaniaeflora. *Journal of Ethnopharmacology, 79*(3), 379-381.

Fan, Y., He, X., Zhou, S., Luo, A., He, T., & Chun, Z. (2009). Composition analysis and Antioxidant activity of polysaccharide from *Dendrobium denneanum*. *Biological Macromolecules Journal, 45,* 169–173.

Johnson, M., & Janakiraman, N. (2013). Phytochemical and TLC studies on stem and leaves of the orchid Dendrobium panduratum subsp. *villosum* Gopalan & A. N. Henry. *Indian Journal of Natural Products and Resources, 4*(3), 250–254.

Luo, A., He, X., Zhou, S., Fan, Y., He, T., & Chun, Z. (2009). In vitro antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide derived from *Dendrobium nobile* Lindl. extracts. *Biological Macromolecules Journal, 45,* 359–363.

Majhenic, L., Skerget, M., & Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extract. *Food Chemistry*, *104*(3), 1258-1268.

Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extract of seashore plant and identification of potent inhibitors from Garciniasubelliptica. *Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*, *69*, 197–201.

Prajapati, Ch. N., & Patel, N. M. (2013). Physico-Chemical and Phytochemical Evaluation of Dendrobium macraei Roots. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4*(1), 75–80.

Prieto. P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry, 269*, 337-341.

Sazada, S., Verma, A., Rather, A.A., Jabeen, F., & Meghvansi, M.K. (2009). Preliminary phytochemicals analysis of some important medicinal and aromatic plants. *Advances in Biological Research*, *3*, 188–195.

Shyam-Krishnan, M., Dhanalakshmi, P., Sudhalakshmi, G.Y., Gopalakrishnan, S., Manimaran, A., Sindhu, S., Sagadevan, E., & Arumugam, P. (2013). Evaluation of phytochemical constituents and antioxidant activity of Indian medicinal plant Hydnocarpuspentandra. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *5*, 453–458.

T.S., Sh., Lee, P., & Hung, L. (2010). Radical Scavenging Activities of Extract and Solvent-Solvent Partition Fractions from Dendrobium Sonia “Red Bom” Flower. *IEEE International Conference on Science and Social Research, 978*, 762–765.

Tadokoro, T., Bonte, F., Archambault, J., Cauchard, J., Neveu, M., Ozawa, K., Noguchi, F., Ikeda, A., Nagamatsu, M., & Shinn, S. (2010). Whitening efficacy of plant extracts including orchid extracts on Japanese female skin with melisma and lentigo senilis. *Journal of Dermatology, 37*, 522-530.

ภาคผนวก

การคำนวณร้อยละผลผลิต (% yield)

จากสูตร %yield = (น้ำหนักสารสกัดหยาบ / น้ำหนักตัวอย่าง) x 100

ดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล

น้ำหนักของสารสกัดหยาบ = 104.09 กรัม

น้ำหนักของดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล = 2,977.65 กรัม

แทนค่า %yield = (น้ำหนักสารสกัดหยาบ / น้ำหนักตัวอย่าง) x 100

%yield = (104.09/2,977.65) x 100

%yield = 3.50

สารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุลในชั้นเอทานอล มี %yield = 3.50

ตารางภาคผนวกที่ 1 น้ำหนักของดอกกล้วยไม้สด น้ำหนักสารสกัดหยาบ และร้อยละผลผลิต

สารสกัดส่วนเอทานอลของดอกกล้วยไม้	น้ำหนักของดอกกล้วยไม้สด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (%yield)
เอียสกุล	2,977.65	104.09	3.50
เจสซิก้า	2,478.67	80.03	3.23
บูรณะเจต	2,154.30	71.75	3.33
ขาว 5 เอ็น	1,620.20	105.29	6.50

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การเตรียมสาร

1. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu โดยเจือจางเป็น 1:10 (v/v) ด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียมสารละลาย Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 0.10 mg/mL ในเมทานอล

โดยชั่ง Gallic acid 0.10 mg ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 100.00 - 0.19 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

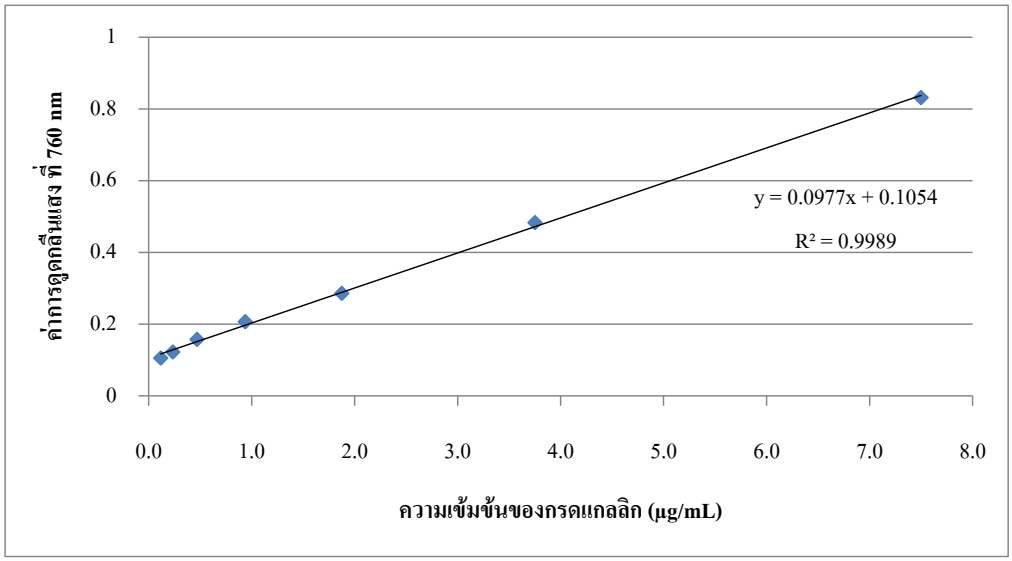
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 5.00 mg/mL ในเมทานอล

โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร

จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสามาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของ	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm**			**เฉลี่ย**
กรดแกลลิก (µg/mL)	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	
0.12	0.107	0.104	0.105	0.105±0.00
0.23	0.121	0.122	0.123	0.122±0.00
0.47	0.158	0.155	0.159	0.157±0.00
0.94	0.229	0.226	0.164	0.206±0.04
1.88	0.285	0.289	0.283	0.286±0.00
3.75	0.488	0.524	0.437	0.483±0.04
7.50	0.831	0.832	0.832	0.832±0.00



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ได้สมการ $y = 0.0977x + 0.1054$, $R^2 = 0.9989$

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้	**ความเข้มข้น**		**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm**		
	เริ่มต้น mg/mL	**สุดท้าย mg/mL**	**ครั้งที่1**	**ครั้งที่2**	**ครั้งที่3**
เอียสกุล	5.40	0.810	0.481	0.505	0.552
เจสซิก้า	5.20	0.780	0.462	0.467	0.489
บูรณะเจต	5.10	0.765	0.137	0.208	0.172
ขาว 5 เอ็น	5.00	0.750	0.474	0.490	0.517

วิธีการการคำนวณ

หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม ($mgGAE.g^{-1}$) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างเช่น

จากสมการ $y = 0.0977x + 0.1054$

แทนค่า $y = 0.481$

$$0.481 = 0.0977x + 0.1054$$

$$x = 3.844$$

สารตัวอย่าง 0.810 มิลลิกรัม มีปริมาณฟีนอลิกรวม 3.844 $\mu gGAE.g^{-1}$

ดังนั้นถ้าสารตัวอย่าง 1000 มิลลิกรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 4,785.19 $\mu gGAE.g^{-1}$ จากนั้นนำค่าปริมาณฟีนอลิกรวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยก็จะได้ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล

ตารางภาคผนวกที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้	**ปริมาณฟีนอลิกรวม ($\mu gGAE.g^{-1}$)**				**$mgGAE.g^{-1}$**
	ครั้งที่1	**ครั้งที่2**	**ครั้งที่3**	**เฉลี่ย**	
เอียสกุล	4785.19	5091.00	5689.19	5188.58	5.19±0.46
เจสซิก้า	4718.48	4784.56	5075.34	4859.46	4.86±0.19
บูรณะเจต	431.24	1388.05	902.90	1145.48	1.15±0.34
ขาว 5 เอ็น	5072.17	5292.10	5663.23	5342.50	5.34±0.30

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การเตรียมสาร

1. เตรียมสารละลาย Aluminium trichloride ($AlCl_3$) ความเข้มข้น 2.0% (w/v) ในตัวทำละลายเมทานอล

2. เตรียมสารละลาย Quercetin ที่มีความเข้มข้น 0.10 mg/mL ในเมทานอล

โดยชั่ง Quercetin 0.10 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 100.00 - 0.19 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

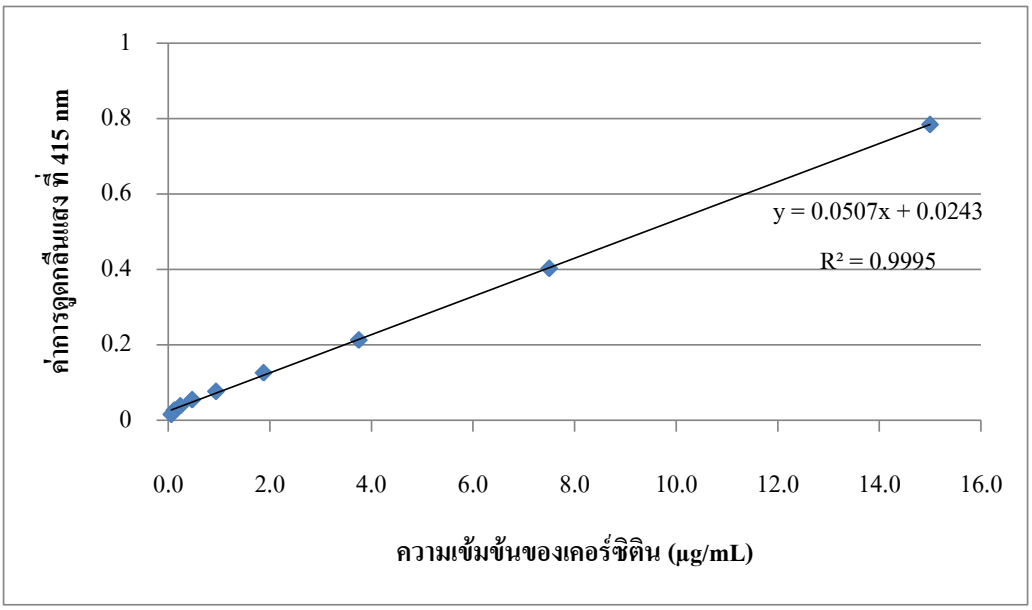
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 5.00 mg/mL ในเมทานอล

โดยชั่งสารตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร

จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย $AlCl_3$ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสามาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

ความเข้มข้นของเคอร์ซิติน (µg/mL)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm**			**เฉลี่ย**
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	
0.06	0.011	0.017	0.018	0.015±0.00
0.12	0.026	0.028	0.025	0.026±0.00
0.23	0.036	0.038	0.040	0.038±0.00
0.47	0.050	0.055	0.058	0.054±0.00
0.94	0.074	0.079	0.076	0.076±0.00
1.88	0.123	0.131	0.123	0.126±0.00
3.75	0.212	0.213	0.213	0.213±0.00
7.50	0.399	0.408	0.401	0.403±0.00
15.00	0.787	0.786	0.780	0.784±0.00



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

กราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin ได้สมการ $y = 0.0507x + 0.0243$, $R^2 = 0.9995$

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้	**ความเข้มข้น**		**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm**	
	เริ่มต้น mg/mL	**สุดท้าย mg/mL**	**ครั้งที่1**	**ครั้งที่2**
เอียสกุล	5.0	0.750	0.174	0.159
เจสซิก้า	5.5	0.825	0.186	0.193
บูรณะเจต	5.0	0.750	0.065	0.067
ขาว 5 เอ็น	5.2	0.780	0.067	0.078

วิธีการการคำนวณ

หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม ($mgQE.g^{-1}$) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างเช่น

จากสมการ $y = 0.0507x + 0.0243$

แทนค่า $y = 0.174$

$$0.174 = 0.0507x + 0.0243$$

$$x = 3.000$$

สารตัวอย่าง 0.750 มิลลิกรัม มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 3.000 $\mu gQE.g^{-1}$

ดังนั้นถ้าสารตัวอย่าง 1000 มิลลิกรัม จะมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 4,000.000 $\mu gQE.g^{-1}$ จากนั้นนำค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยก็จะได้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล

ตารางภาคผนวกที่ 7 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้	**ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ($\mu gQE.g^{-1}$)**			**$mgQE.g^{-1}$**
	ครั้งที่1	**ครั้งที่2**	**เฉลี่ย**	
เอียสกุล	4000.00	3600.00	3800.00	3.80±0.28
เจสซิก้า	3927.27	4096.97	4012.12	4.01±0.12
บูรณะเจต	1093.33	1146.67	1120.00	1.12±0.04
ขาว 5 เอ็น	1102.56	1384.62	1243.59	1.24±0.20

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity)

การเตรียมสาร

1. เตรียมสารละลาย Phosphomolybdate reagent โดยผสมสารดังต่อไปนี้

1.1) 0.60 M sulfuric acid (H_2SO_4) ปริมาตร 100 mL

1.2) 4.00 mM ammonium molydate ปริมาตร 100 mL

1.3) 28.00 mM sodium phosphate (Na_3PO_4) ปริมาตร 100 mL

2. เตรียมสารละลายวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่มีความเข้มข้น 5.00 mg/mL ในเมทานอล โดยชั่ง L-ascorbic acid 5.00 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.625 - 0.002 mg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

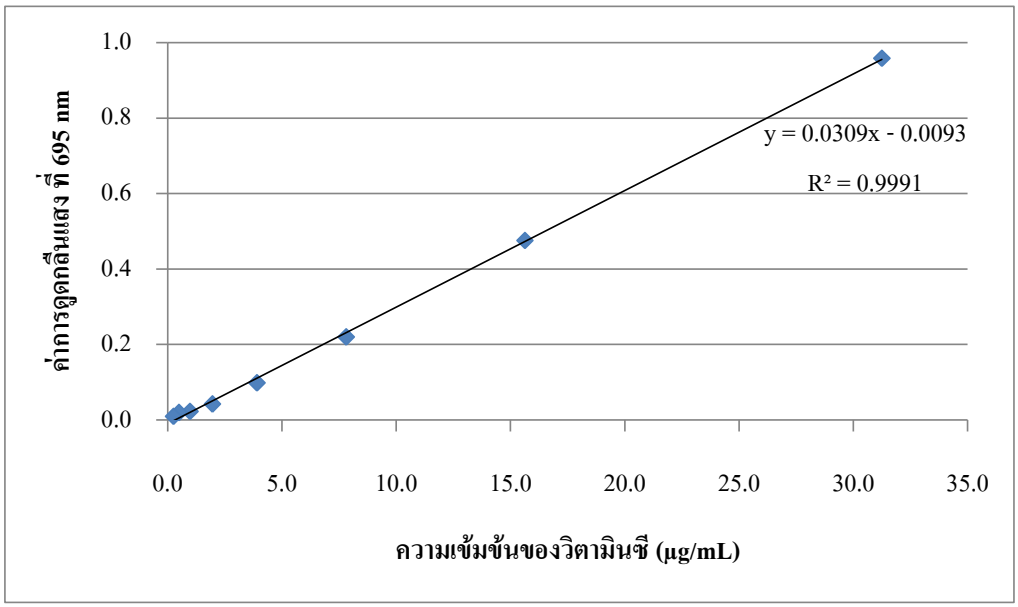
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 2.00 mg/mL ในเมทานอล

โดยชั่งสารตัวอย่าง 2 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร

จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Phosphomolybdate reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสามาตรฐานวิตามินซี (L-ascorbic acid)

ความเข้มข้นของ วิตามินซี (µg/mL)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm**			**เฉลี่ย**
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	
0.24	0.009	0.008	0.012	0.010±0.00
0.49	0.020	0.021	0.018	0.020±0.00
0.98	0.021	0.024	0.024	0.023±0.00
1.95	0.040	0.043	0.044	0.042±0.00
3.91	0.099	0.095	0.101	0.098±0.00
7.81	0.216	0.222	0.222	0.220±0.00
15.63	0.484	0.473	0.471	0.476±0.01
31.25	0.957	0.968	0.951	0.959±0.01



ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานวิตามินซี (L-ascorbic acid)

กราฟมาตรฐานของสารละลาย L-ascorbic acid ได้สมการ $y = 0.0309x - 0.0093$, $R^2 = 0.9991$

ตารางภาคผนวกที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้	**ความเข้มข้น**		**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm**		
	เริ่มต้น mg/mL	**สุดท้าย mg/mL**	**ครั้งที่1**	**ครั้งที่2**	**ครั้งที่3**
เอียสกุล	2.0	0.200	0.017	0.017	0.016
เจสซิก้า	2.0	0.200	0.081	0.020	0.019
บูรณะเจต	2.0	0.200	0.018	0.019	0.019
ขาว 5 เอ็น	2.0	0.200	0.022	0.024	0.022

วิธีการการคำนวณ

หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม ($mgAE.g^{-1}$) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างเช่น

จากสมการ $y = 0.0309x - 0.0093$

แทนค่า $y = 0.017$

$0.017 = 0.0309x - 0.0093$

$x = 0.867$

สารตัวอย่าง 0.200 มิลลิกรัม มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม 0.867 $\mu gAE.g^{-1}$

ดังนั้นถ้าสารตัวอย่าง 1000 มิลลิกรัม จะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมเท่ากับ 4,335.000 $\mu gAE.g^{-1}$ จากนั้นนำค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยก็จะได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมในสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล

ตารางภาคผนวกที่ 10 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 4 ชนิด

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้	**สารต้านอนุมูลอิสระรวม ($\mu gAE.g^{-1}$)**				**$mgAE.g^{-1}$**
	ครั้งที่1	**ครั้งที่2**	**ครั้งที่3**	**เฉลี่ย**	
เอียสกุล	4333.33	4333.33	4166.67	4277.78	4.28±0.10
เจสซิก้า	15000.00	4833.33	4666.67	4750.00	4.75±0.12
บูรณะเจต	4500.00	4666.67	4666.67	4611.11	4.61±0.10
ขาว 5 เอ็น	5166.67	5500.00	5166.67	5277.78	5.28±0.19

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

การเตรียมสาร

1. สารละลาย DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ (20 µg/mL) โดยชั่ง DPPH 10.00 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 500 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (Ascorbic acid) ที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL ในเมทานอล โดยชั่งสารมาตรฐาน อย่างละ 0.10 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตรจากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 20.00 - 0.16 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5.00 mg/mL ในตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงอย่างน้อย 8 ความเข้มข้น

ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (µg/mL)	**ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)**			**% DPPH radical inhibition**			
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**เฉลี่ย**
0.02	0.431	0.431	0.431	3.36	4.43	5.07	4.29±0.86
0.03	0.419	0.423	0.423	6.05	6.21	6.83	6.36±0.41
0.06	0.396	0.397	0.400	11.21	11.97	11.89	11.69±0.42
0.13	0.369	0.364	0.367	17.26	19.29	19.16	18.57±1.13
0.25	0.315	0.323	0.305	29.37	28.38	32.82	30.19±2.33
0.50	0.253	0.244	0.25	43.27	45.90	44.93	44.70±1.33
1.00	0.035	0.11	0.144	92.15	75.61	68.28	71.95±5.18
2.00	0.023	0.021	0.021	94.84	95.34	95.37	95.19±0.30
Control (A)	0.446	0.451	0.454				

ตารางภาคผนวกที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

ความเข้มข้นของเคอร์ซิติน (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% DPPH radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.02	0.431	0.433	0.441	4.22	3.13	1.56	2.97±1.66
0.03	0.428	0.423	0.423	4.89	5.37	5.58	5.28±0.73
0.06	0.415	0.423	0.413	7.78	5.37	7.81	6.99±1.40
0.13	0.391	0.401	0.397	13.11	10.29	11.38	11.60±1.42
0.25	0.359	0.300	0.375	20.22	32.89	16.29	23.13±8.67
0.50	0.301	0.296	0.304	33.11	33.78	32.14	33.01±0.82
1.00	0.129	0.162	0.155	71.33	63.76	65.40	66.83±3.98
2.00	0.019	0.019	0.018	95.78	95.75	95.98	95.84±0.13
Control (A)	0.450	0.447	0.448				

ตารางภาคผนวกที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid)

ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% DPPH radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.02	0.440	0.444	0.444	0.68	0.89	1.77	1.11±0.63
0.03	0.440	0.435	0.435	0.68	2.90	3.76	2.45±1.59
0.06	0.401	0.436	0.434	9.48	2.68	3.98	5.38±3.61
0.13	0.421	0.426	0.424	4.97	4.91	6.19	5.36±0.73
0.25	0.384	0.341	0.391	13.32	23.88	13.50	16.90±6.05
0.50	0.323	0.326	0.327	27.09	27.23	27.65	27.33±0.29
1.00	0.203	0.177	0.177	54.18	60.49	60.84	58.50±3.75
2.00	0.012	0.012	0.013	97.29	97.32	97.12	97.25±0.11
Control (A)	0.443	0.448	0.452				

ตารางภาคผนวกที่ 14 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid)

ความเข้มข้น (µg/mL)	% DPPH radical inhibition		
	กรดแกลลิก	เคอร์ซิติน	วิตามินซี
0.02	4.29±0.86	2.97±1.66	1.11±0.63
0.03	6.36±0.41	5.28±0.73	2.45±1.59
0.06	11.69±0.42	6.99±1.40	5.38±3.61
0.13	18.57±1.13	11.60±1.42	5.36±0.73
0.25	30.19±2.33	23.13±8.67	16.90±6.05
0.50	44.70±1.33	33.01±0.82	27.33±0.29
1.00	71.95±5.18	66.83±3.98	58.50±3.75
2.00	95.19±0.30	95.84±0.13	97.25±0.11

ตารางภาคผนวกที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% DPPH radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
3.91	0.481	0.482	-	0.83	0.620	-	0.72±0.15
7.81	0.483	-	0.481	0.41	-	0.83	0.62±0.29
15.63	0.480	0.484	0.484	1.03	0.21	0.21	0.48±0.48
31.25	0.477	0.481	0.479	1.65	0.83	1.24	1.24±0.41
62.50	0.483	0.472	0.468	0.41	2.68	3.51	2.20±1.60
125.00	0.451	0.465	0.465	7.01	4.12	4.12	5.09±1.67
250.00	0.405	0.418	0.421	16.50	13.81	13.20	14.50±1.75
500.00	0.317	0.332	0.332	34.64	31.55	31.55	32.58±1.79
Control (A)	0.482	0.488	0.486				

ตารางภาคผนวกที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เจสซิก้า

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% DPPH radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
3.91	0.431	0.436	0.437	0.00	-	-	0.00±0.00
7.81	0.430	0.434	0.423	0.23	-	1.86	1.04±1.15
15.63	0.427	0.432	0.431	0.93	-	0.00	0.93±0.66
31.25	0.423	0.425	0.428	1.86	1.39	0.70	1.32±0.58
62.50	0.411	0.410	0.414	4.64	4.87	3.94	4.49±0.48
125.00	0.384	0.388	0.389	10.91	9.98	9.75	10.21±0.61
250.00	0.315	0.317	0.331	26.91	26.45	23.20	25.52±2.02
500.00	0.189	0.199	0.204	56.15	53.83	52.67	54.22±1.77
Control (A)	0.432	0.431	0.430				

ตารางภาคผนวกที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บูรณะเจต

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% DPPH radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
3.91	0.280	0.282	0.280	0.00	-	0.00	0.00±0.00
7.81	0.277	0.280	0.280	1.07	0.00	0.00	0.36±0.62
15.63	0.276	0.280	0.276	1.43	0.00	1.43	0.95±0.82
31.25	0.269	0.274	0.274	3.93	2.14	2.14	2.74±1.03
62.50	0.265	0.269	0.277	5.36	3.93	1.07	3.45±2.18
125.00	0.250	0.250	0.251	10.71	10.71	10.36	10.60±0.21
250.00	0.214	0.209	0.217	23.57	25.36	22.50	23.81±1.44
500.00	0.162	0.154	0.155	42.14	45.00	44.64	43.93±1.56
Control (A)	0.281	0.280	0.280				

ตารางภาคผนวกที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% DPPH radical inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
3.91	0.421	-	0.421	0.71	-	0.71	0.71±0.00
7.81	0.417	0.417	0.405	1.65	1.65	4.48	2.59±1.63
15.63	0.416	0.414	0.416	1.89	2.36	1.89	2.04±0.27
31.25	0.408	0.407	0.404	3.77	4.01	4.72	4.17±0.49
62.50	0.395	0.397	0.394	6.84	6.37	7.08	6.76±0.36
125.00	0.362	0.366	0.368	14.62	13.68	13.21	13.84±0.72
250.00	0.305	0.311	0.309	28.07	26.65	27.12	27.28±0.72
500.00	0.202	0.213	0.215	52.36	49.76	49.29	50.47±1.65
Control (A)	0.425	0.422	0.425				

ตัวอย่าง การคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH radical inhibition) ของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL

จากสมการ %DPPH radical inhibition = [(A–B)/A] × 100

แทนค่า เมื่อ A = 0.485

B = 0.317

%DPPH radical inhibition = [(0.485–0.317)/0.485] × 100

%DPPH radical inhibition = 34.64

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ที่ความเข้มข้น 500.00 µg/mL มีค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 34.64

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay) โดยมีซับสเตรทเป็น L-tyrosine

1. เตรียม Phosphate buffer pH 6.8 ที่มีความเข้มข้น 50.00 mM โดยผสมสารดังต่อไปนี้
   1.1 เตรียม mono basic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$) 0.20 M
   (stock A : ชั่ง NaH_2PO_4 15.601 g (MW = 156.01 g/mol) ละลายในน้ำปริมาตร 500 mL)
   1.2 เตรียม dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) 0.20 M
   (stock B : ชั่ง Na_2HPO_4 17.799 g (MW = 177.99 g/mol) ละลายในน้ำปริมาตร 500 mL)
   1.3 นำสารละลาย A ปริมาตร 51 mL และสารละลาย B ปริมาตร 49 mL มาผสมกัน วัด pH ให้ได้ 6.8 ถ้าไม่ได้ให้ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl เมื่อได้ pH 6.8 แล้ว ให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 mL (0.10 M) แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50.00 mM
2. เอนไซม์ Tyrosinase ละลายใน phosphate buffer ความเข้มข้น 800 U/mL
3. สารมาตรฐาน Kojic acid ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.00 mg/mL (การเตรียม Kojic acid 20.00 mg/mL: ชั่ง Kojic acid 20.00 mg ละลายในเมทานอล 1 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 20.00–0.15 mg/mL)
4. สารละลาย L-Tyrosine ละลายใน phosphate buffer ความเข้มข้น 3.00 mM
5. สารละลายตัวอย่าง ในตัวทำละลาย 80% เมทานอล ความเข้มข้น 20.00–0.15 mg/mL

ตารางภาคผนวกที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid)

ความเข้มข้นของกรดโคจิก (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.099	0.100	0.101	18.85	18.03	17.21	18.03±0.47
0.07	0.091	0.092	0.092	25.41	24.59	24.59	24.86±0.47
0.13	0.070	0.069	0.070	42.62	43.44	42.62	42.90±0.47
0.25	0.026	0.028	0.029	78.69	77.05	76.23	77.32±1.25
0.50	0.010	0.009	0.010	91.80	92.62	91.80	92.08±0.47
1.00	0.005	0.006	0.006	95.90	95.08	95.08	95.36±0.47
2.00	0.001	0.002	0.001	99.18	98.36	99.18	98.91±0.82
Control (A)	0.123	0.121	0.122				

ตารางภาคผนวกที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.118	0.117	0.120	43.18	43.66	42.22	43.02±0.74
0.07	0.108	0.104	0.107	47.99	49.92	48.48	48.80±1.00
0.13	0.086	0.084	0.082	58.59	59.55	60.51	59.55±0.96
0.25	0.063	0.064	0.065	69.66	69.18	68.70	69.18±0.48
0.50	0.045	0.042	0.043	78.33	79.78	79.30	79.13±0.74
1.00	0.027	0.024	0.030	87.00	88.44	85.55	87.00±1.44
2.00	0.025	0.023	0.023	87.98	88.93	88.93	88.60±0.56
Control (A)	0.205	0.209	0.209				

ตารางภาคผนวกที่ 21 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เจสซิก้า

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.133	0.128	0.129	37.46	39.81	39.34	38.87±1.24
0.07	0.123	0.126	0.127	42.16	40.75	40.28	41.07±0.98
0.13	0.075	0.072	0.075	64.73	66.14	64.73	65.20±0.81
0.25	0.052	0.051	0.055	75.55	76.02	74.14	75.24±0.98
0.50	0.043	0.043	0.045	79.78	79.78	78.84	79.47±0.54
1.00	0.025	0.027	0.026	88.25	87.30	87.77	87.77±0.47
2.00	0.011	0.008	0.009	94.83	96.24	95.77	95.61±0.72
Control (A)	0.211	0.213	0.214				

ตารางภาคผนวกที่ 22 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บูรณะเจต

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.154	0.152	0.155	25.24	26.21	24.76	25.41±0.74
0.07	0.14	0.141	0.14	32.04	31.55	32.04	31.88±0.28
0.13	0.115	0.112	0.112	44.18	45.63	45.63	45.15±0.84
0.25	0.077	0.079	0.076	62.62	61.65	63.11	62.46±0.74
0.50	0.054	0.054	0.056	73.79	73.79	72.82	73.46±0.56
1.00	0.041	0.041	0.039	80.10	80.10	81.07	80.42±0.56
2.00	0.031	0.029	0.027	84.95	85.92	86.89	85.92±0.97
Control (A)	0.207	0.204	0.207				

ตารางภาคผนวกที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.156	0.154	0.155	28.55	29.47	29.01	29.01±0.46
0.07	0.134	0.132	0.132	38.63	39.54	39.54	39.24±0.53
0.13	0.101	0.098	0.097	53.74	55.12	55.57	54.81±0.95
0.25	0.053	0.056	0.054	75.73	74.35	75.27	75.12±0.70
0.50	0.030	0.029	0.029	86.26	86.72	86.72	86.57±0.26
1.00	0.020	0.018	0.021	90.84	91.76	90.38	90.99±0.70
2.00	0.013	0.010	0.012	94.05	95.42	94.50	94.66±0.70
Control (A)	0.215	0.219	0.221				

ตัวอย่าง การคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล โดยมี L-Tyrosine เป็นซับสเตรท ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL

จากสมการ $\%\text{Tyrosinase inhibition} = [(A–B)/A] \times 100$

แทนค่า เมื่อ $A = 0.208$

$B = 0.025$

$\%\text{Tyrosinase inhibition} = [(0.208–0.025)/0.208] \times 100$

$\%\text{Tyrosinase inhibition} = 87.98$

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL ครั้งที่ 1 มีค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 87.98

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay) โดยมีซับสเตรทเป็น L-DOPA

1. เตรียม Phosphate buffer pH 6.8 ที่มีความเข้มข้น 50.00 mM โดยผสมสารดังต่อไปนี้
   1.1 เตรียม mono basic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$) 0.20 M
   (stock A : ชั่ง NaH_2PO_4 15.601 g (MW = 156.01 g/mol) ละลายในน้ำปริมาตร 500 mL)
   1.2 เตรียม dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) 0.20 M
   (stock B : ชั่ง Na_2HPO_4 17.799 g (MW = 177.99 g/mol) ละลายในน้ำปริมาตร 500 mL)
   1.3 นำสารละลาย A ปริมาตร 51 mL และสารละลาย B ปริมาตร 49 mL มาผสมกัน วัด pH ให้ได้ 6.8 ถ้าไม่ได้ให้ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl เมื่อได้ pH 6.8 แล้ว ให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 mL (0.1 M) แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50.00 mM
2. เอนไซม์ Tyrosinase ละลายใน phosphate buffer ความเข้มข้น 400 U/mL
3. สารมาตรฐาน Kojic acid ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.00 mg/mL (การเตรียม Kojic acid 20.00 mg/mL: ชั่ง Kojic acid 20.00 mg ละลายในเมทานอล 1 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 20.00–0.15 mg/mL)
4. สารละลาย L-DOPA ละลายใน phosphate buffer ความเข้มข้น 3.00 mM
5. สารละลายตัวอย่าง ในตัวทำละลาย 80% เมทานอล ความเข้มข้น 20.00–0.15 mg/mL

ตารางภาคผนวกที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid)

ความเข้มข้นของกรดโคจิก (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.039	0.038	0.040	82.67	83.11	82.22	82.67±0.44
0.07	0.028	0.029	0.030	87.56	87.11	86.67	87.11±0.44
0.13	0.017	0.017	0.017	92.44	92.44	92.44	92.44±0.00
0.25	0.006	0.005	0.006	97.33	97.78	97.33	97.48±0.26
0.50	0.004	0.001	0.004	98.22	99.56	98.22	98.67±0.77
1.00	0.002	0.002	0.002	99.11	99.11	99.11	99.11±0.00
2.00	0.001	0.000	0.001	99.56	100.00	99.56	99.70±0.26
Control (A)	0.219	0.223	0.233				

ตารางภาคผนวกที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.152	0.151	0.155	21.65	22.17	20.10	21.31±1.07
0.07	0.136	0.138	0.134	29.90	28.87	30.93	29.90±1.03
0.13	0.121	0.119	0.12	37.63	38.66	38.14	38.14±0.52
0.25	0.111	0.113	0.111	42.78	41.75	42.78	42.44±0.60
0.50	0.101	0.099	0.102	47.94	48.97	47.42	48.11±0.79
1.00	0.092	0.095	0.095	52.58	51.03	51.03	51.55±0.89
2.00	0.083	0.079	0.082	57.22	59.28	57.73	58.08±1.07
Control (A)	0.193	0.194	0.195				

ตารางภาคผนวกที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เจสซิก้า

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.185	0.186	0.185	3.14	2.62	3.14	2.97±0.30
0.07	0.182	0.183	0.183	4.71	4.19	4.19	4.36±0.30
0.13	0.175	0.176	0.173	8.38	7.85	9.42	8.55±0.80
0.25	0.162	0.160	0.160	15.18	16.23	16.23	15.88±0.60
0.50	0.149	0.150	0.149	21.99	21.47	21.99	21.82±0.30
1.00	0.126	0.125	0.124	34.03	34.56	35.08	34.56±0.52
2.00	0.102	0.106	0.103	46.60	44.50	46.07	45.72±1.09
Control (A)	0.191	0.192	0.190				

ตารางภาคผนวกที่ 27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บูรณะเจต

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.170	0.171	0.171	12.52	12.01	12.01	12.18±0.30
0.07	0.166	0.169	0.167	14.58	13.04	14.07	13.89±0.79
0.13	0.159	0.158	0.158	18.18	18.70	18.70	18.53±0.30
0.25	0.148	0.152	0.148	23.84	21.78	23.84	23.16±1.19
0.50	0.124	0.124	0.123	36.19	36.19	36.71	36.36±0.30
1.00	0.106	0.108	0.104	45.46	44.43	46.48	45.46±1.03
2.00	0.089	0.085	0.087	54.20	56.26	55.23	55.23±1.03
Control (A)	0.196	0.193	0.194				

ตารางภาคผนวกที่ 28 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (nm) (B)			% Tyrosinase inhibition			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.03	0.163	0.164	0.165	12.21	11.67	11.13	11.67±0.54
0.07	0.155	0.157	0.159	16.52	15.44	14.36	15.44±1.08
0.13	0.147	0.147	0.150	20.83	20.83	19.21	20.29±0.93
0.25	0.133	0.134	0.133	28.37	27.83	28.37	28.19±0.31
0.50	0.111	0.115	0.112	40.22	38.06	39.68	39.32±1.12
1.00	0.088	0.089	0.089	52.60	52.07	52.07	52.24±0.31
2.00	0.072	0.075	0.074	61.22	59.61	60.14	60.32±0.82
Control (A)	0.185	0.184	0.188				

ตัวอย่าง การคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล โดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL

จากสมการ %Tyrosinase inhibition = [(A–B)/A] × 100

แทนค่า เมื่อ A = 0.194

B = 0.083

%Tyrosinase inhibition = [(0.194–0.083)/0.194] × 100

%Tyrosinase inhibition = 57.22

สารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุล ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL ครั้งที่ 1 มีค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 57.22