บทความวิจัย

ปริมาณสารพฤกษเคมีและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์

PHYTOCHEMICAL CONTENTS AND ANTIOXIDANTS ACTIVITY OF EXTRACTS FROM ROCCO DEEP GOLD MARIGOLD FLOWERS (*TAGETES ERECTA* L.)

สุพจน์ ทับทิมใหญ่[1] คงศักดิ์ บุญยะประณัย[2] ลัดดาวัลย์ พะวร[3*] และ อรอุมา จันทร์เสถียร[4]

[1,3,4]คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา นครราชสีมา 30000

[2]สถาบันวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

Suphod Tabtimyai[1], Kongsak Boonyapranai[2], Laddawan Phawon[3*] and Onuma Chansatein[4]

[1,3,4]Faculty of Allied Health Sciences, Nakhon Ratchasima College,
Nakhon Ratchasima 30000

[2]Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University,
Chiang Mai 50200

[*]E-mail: laddawam@nmc.ac.th

Received: 03-05-2022

Revised: 18-10-2022

Accepted: 19-10-2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดโดยวิธีต้มด้วยน้ำ วิธีแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล 50% และวิธีซอกห์เลตด้วยเอทานอล 95% ต่อปริมาณสารพฤกษเคมี กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้ เอทานอล 95% จากดอกดาวเรืองมีปริมาณสารฟีนอลิกและแคโรทีนอยด์สูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น (63.9±0.01 mg GAE/g extract และ 103.95 mg/g extract ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล 50% มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (174.30±0.07 mg/g extract) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่าสารสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 0.45±0.00 mg/ml) และการทดสอบการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนในระดับหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดของดาวเรืองที่สกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95% และสารสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับ 74.44%, 54.30% และ 38.67% ตามลำดับ

คำสำคัญ: ดอกดาวเรือง สารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ABSTRACT

This research aimed to study was compared to other processes including aqueous decoction, maceration and Soxhlet extraction on the photochemical contents, antioxidant activities and Anti-denaturation activity of marigold flowers (Rocco Deep Gold). The results showed that 95% ethanol Soxhlet extraction of flowers contained higher content of phenolics and carotenoids than the other extracts (63.9±0.01 mg GAE/g extract and 103.95 mg/g extract, respectively). Fifty percentage ethanol maceration of flowers also contained high levels of flavonoids (174.30±0.07 mg/g extract). In regard to the antioxidant of DPPH radical scavenging. Ninety-five percentage ethanol Soxhlet extraction extract of flowers showed stronger inhibition effect than other extracts. (IC_{50}=0.45±0.00 mg/ml). The in vitro anti-Denaturation activity that aqueous extracted has the highest % inhibition, followed by 95% ethanol Soxhlet extraction and 50% ethanol maceration. the inhibitory activity was 74.44%, 54.30% and 38.67%, respectively.

Keywords: Marigold Flowers, Phytochemical, Antioxidant

บทนำ

ดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่เกษตรกรนิยมปลูก เนื่องจากดาวเรืองได้รับความนิยมมากในประเทศไทยสามารถใช้ได้ตั้งแต่ปลูกเป็นไม้ประดับ และไม้กระถาง ใช้เป็นดอกไม้หน้าแท่นบูชาพระ เป็นไม้ตัดดอกเพื่อใช้ทำพวงมาลัยในพิธีกรรมทางศาสนา ใช้แสดงความยินดีในเทศกาลต่าง ๆ ตลอดจนใช้เป็นไม้ประดับสถานที่ นอกจากนี้ยังมีการใช้ดาวเรืองในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เครื่องสำอาง สีผสมอาหาร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วย (Karwani et al., 2015) เนื่องจากในดอกดาวเรืองมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ไทโอฟีน (Thiophene) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และอื่น ๆ (Xu et al., 2012) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจมากมาย อาทิเช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Burlec et al., 2019) ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Kaisoon et al., 2012) ต้านเบาหวาน (ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase และ α-amylase) ลดไขมัน (Wang et al., 2016) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Saani et al., 2017) และช่วยให้นอนหลับ คลายความกังวล (Pérez et al., 2017) เป็นต้น

ดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์เป็นสายพันธุ์ที่สามารถปลูกได้ทั้งปี ดอกมีลักษณะกลม กลีบดอกแน่น ขนาดใหญ่ มีสีสันสวยงาม เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อตัดดอกขายเป็นจำนวนมาก (Isantea & Wongkrajang, 2015) เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ดอกดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ จึงมีความสนใจศึกษาดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ และจากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในดาวเรืองทั่วไป พบสารประกอบ ฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบของสารสำคัญ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ชะลอความเสื่อมชราของเซลล์ผิว แต่งานวิจัยเกี่ยวกับสารสำคัญของดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ในประเทศไทยยังมีอยู่ไม่มากนัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการและชนิดของสารที่ละลายที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารสำคัญ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกร็อคโค่ดีฟโกลด์ รวมทั้งการทดสอบการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนในระดับหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลเรื่องวิธีการที่ดีในการสกัดสาร เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ดอกดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ และนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอางหรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดอกดาวเรืองสายพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ (ลูกผสม) จากตลาดต้นพะยอม จังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ 2565 ตรวจเอกลักษณ์ด้วยรูปวิธาน โดยหน่วยวิจัยโภชนาการศูนย์วิจัยโรคไม่ติดเชื้อและอนามัยสิ่งแวดล้อม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นชั่งน้ำหนักกลีบดอกกับฐานรองดอกให้ได้ 1 กิโลกรัม นำกลีบดอกที่แยกออกจากฐานรองดอกมาชั่งแล้วบันทึกผล นำกลีบดอกดาวเรืองตากไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UNE 400 ประเทศไทย ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตัวอย่างแห้งที่ได้นำมาปั่นให้ละเอียดเป็นผงและชั่งน้ำหนัก

2. การสกัดสารสำคัญจากดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

2.1 การเตรียมสารสกัดจากดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยน้ำกลั่น ด้วยวิธีต้ม (Decoction) ดัดแปลงวิธีมาจาก Chompoo et al. (2021)

นำผงตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2.2 การเตรียมสารสกัดจากดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% ด้วยวิธีการแช่ยุ่ย (Maceration) ดัดแปลงวิธีมาจาก Wongkrajang & Jankam (2017)

นำผงตัวอย่าง 50 กรัม เติมเอทานอล 50% ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ห่อปากขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปเก็บไว้ที่มืด 7 วัน หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2.3 การเตรียมสารสกัดจากดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ด้วยวิธีซอกห์เลต (Soxhlet extraction) ดัดแปลงวิธีมาจาก Phonprapai et al. (2019)

นำผงตัวอย่าง 20 กรัม ที่เตรียมไว้บรรจุใน Timber ล็อกด้วยห่วงพลาสติก จากนั้นเติมเอทานอล 95% ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยเครื่อง Universal extractor (ยี่ห้อ Buchi รุ่น E-800 ประเทศไทย) นำตัวอย่างที่ได้มา Concentrate ให้เหลือสารสกัด 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (Refrigerator) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทดสอบขั้นต่อไป

2.4 การคำนวณหาร้อยละของผลผลิตของสารสกัด (% yield) จากดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

การหา % yield จากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด โดยเริ่มจากการชั่งหลอดทดลองเปล่าของสารสกัด 3 ตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัด 1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลอง นำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำกากสารสกัดที่ได้มาชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นคำนวณหา % yield (Phrompittayarat et al., 2007) ด้วยสูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักหลังสกัด}}{\text{น้ำหนักก่อนสกัด}} \times 100$$

2. การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) จากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

ทดสอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ดัดแปลงตามวิธีของ Folin & Ciocalteu (1927) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นในช่วง 0–0.45 mg/ml โดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และเติมสารสกัดตัวอย่างลงใน 96-well plate ปริมาตร 20 µl เติมสารละลาย Folin Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 µl เติมสารละลาย 1 M $NaHCO_3$ ปริมาตร 80 µl จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ (ยี่ห้อ Spectrostar Nano รุ่น BMD601-0659 ประเทศไทย) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร การทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาปริมาณฟีนอลิก นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของแกลลิก และรายงานผลเป็นค่า Gallic acid equivalents ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม (mg GAE/g extract)

3. การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content) จากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

การทดสอบฟลาโวนอยด์จากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ด้วยวิธี Aluminium trichloride colorimetric ดัดแปลงตามวิธีของ Zhishen et al. (1999) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.00-0.14 mg/ml โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ปิเปตสารสกัดที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 µl จากนั้นเติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟสารละลายมาตรฐานของ Quercetagetin glycosides และแสดงผลเป็นค่า Quercetagetin glycosides equivalents ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม (QGE/g extract)

4. การทดสอบหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม

การทดสอบหาปริมาณการหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ดัดแปลงตามวิธีของ Ranganna (1999) โดยชั่งสารตัวอย่าง 1000 กรัม นำไปอบให้แห้งอุณหภูมิ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแช่ด้วยตัวทำละลาย Acetone ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำมาแยกชั้นด้วย Petroleum ether ปริมาตร 10 ml นำไปเขย่า 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ยาวคลื่น 452 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปคำนวณจากสูตร

$$\text{Total carotenoids} = \frac{3.87 \times A_{452} \times \text{Volume make up} \times \text{Dilution factor} \times 100}{\text{Weight of Sample (g)} \times 1000}$$

A_{452} = ค่าความยาวคลื่นที่วัดได้ที่ 452 นาโนเมตร

Volume make up = ค่าของ Petroleum ether 10 ml

Dilution factor = ค่าที่ทำการ Dilution

Weight of Sample (g) = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงตามวิธีของ Yen & Hsieh (1997) ใช้โทรลอกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ความเข้มข้นในช่วง 0.05-0.45 mg/ml ปิเปตสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น โดยผสมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 µl ลงในเพลท (96-well plate) และเติม DPPH reagent ปริมาตร 125 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สูตร พล็อตกราฟหาค่า IC_{50} ในการรายงานค่าจะรายงานค่าเป็น IC_{50} ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นซึ่งความเข้มข้นที่ 50% inhibition จะมีค่าเป็น IC_{50} โดยคำนวณความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จากสูตร

$$\text{ร้อยละของการยับยั้ง (\% Inhibition)} = \left[\frac{A_{Blank} - B_{Sample}}{A_{Blank}}\right] \times 100$$

7. การทดสอบการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation) ในระดับหลอดทดลอง

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการวัดความสามารถในการยับยั้ง Protein denaturation ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Williams et al. (2008) ดังต่อไปนี้ เตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางครั้งละ 10 เท่า (10 Fold Dilution) จากนั้นปิเปตตัวอย่างมา 500 µl เติม Phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 2.5 ml และเติมไข่ขาว 2 ml ส่วนหลอด Blank และ Control เติม Phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 3 ml แล้วเติมไข่ขาว 2 ml และหลอด Standard IC_{50} เติมยา Diclofenac 0.5 ml เติม Phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 2.5 ml แล้วเติมไข่ขาว 2 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และบ่มต่อในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition) เทียบกับ ตัวควบคุม โดยใช้ Diclofenac sodium เป็นสารมาตรฐาน จากสูตร

$$\text{ร้อยละของการยับยั้ง (\% Inhibition)} = \left[\frac{A_{Control} - B_{Sample}}{A_{Control}}\right] \times 10$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±SD) และวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของข้อมูลโดยใช้ One-way Anova (Single factor) โดยใช้ Duncan multiple comparison tests ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. ผลการสกัดสารจากดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

จากการสกัดสารสำคัญจากดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์พบว่า การสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% มีลักษณะทางกายภาพของสารสกัดมีสีเหลืองเข้ม ไม่มีการแยกชั้น ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น การสกัดสารด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95% ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดมีสีเหลืองเข้มปนส้ม ไม่มีการแยกชั้น แต่มี

ตะกอนสีส้มเกิดขึ้นเมื่อนำไประเหยแห้ง (Evaporator) และการสกัดด้วยวิธีต้มโดยใช้น้ำกลั่น มีลักษณะทางกายภาพของสารสกัดสีเหลืองอ่อน มีการแยกชั้นสีเหลืองเข้มอยู่ข้างบน ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และการเตรียมสารสกัดจากดอกดาวเรือง ทั้ง 3 วิธี ด้วย 3 ตัวทำละลาย พบว่าร้อยละของสารสกัดเมื่อเทียบกับน้ำหนักผงแห้ง (%yield extract/dry) มีค่าดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของการสกัดจากดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี และตัวทำละลาย 3 ชนิด

ตัวทำละลาย	วิธีการสกัด	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด	% yield
น้ำกลั่น	Decoction	มีลักษณะสีเหลืองอ่อนมีการแยกชั้นสีเหลืองเข้มอยู่ข้างบน	28.16
เอทานอล 50%	Maceration	มีลักษณะสีเหลืองเข้มไม่มีการแยกชั้นแต่ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น	30.55
เอทานอล 95%	Soxhlet extractor	มีลักษณะสีเหลืองเข้มปนส้มไม่มีการแยกชั้นแต่มีตะกอนสีส้มเกิดขึ้นเมื่อนำไประเหยแห้ง	28.85

2. ผลการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวมจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

การทดสอบฟีนอลิกจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งการคำนวณใช้สมการของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 3.7954x+0.2015$, $R^2 = 0.9788$) เป็นตัวเทียบเพื่อหาปริมาณฟินอลิก ดังแสดงในภาพที่ 1 จากผลการทดลอง พบว่า ดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยวิธีด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95 % มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 63.90±0.01 mg GAE/g extract และรองลงมาคือวิธีที่สกัดด้วยน้ำคือ 63.90 ± 0.06 mg GAE/g extract ส่วนดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยวิธีการแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล 50 % มีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุดคือ 58.70 ± 0.02 mg GAE/g extract ดังแสดงในตารางที่ 2 อาจเป็น ผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไปมีโครงสร้างทางเคมีจัดอยู่ในกลุ่มที่มีขั้วปานกลาง จึงทำให้ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นกัน ส่งผลให้สารสำคัญที่อยู่ในดอกดาวเรืองถูกปลดปล่อยออกมากับตัวทำละลาย (Pietta, 2000)

3. ผลการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

การทดสอบฟลาโวนอยด์จากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยวิธี Aluminium trichloride colorimetric โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งการคำนวณใช้สมการของกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ($y = 20.953x+0.3234$, $R^2 = 0.9896$) เป็นตัวเทียบเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในภาพที่ 2 จากผลการทดลอง พบว่าดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยโดยเอทานอล 50% มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ 174.30 ± 0.07 mg QGE/g extract และรองลงมาคือการสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95% คือ 100.30 ± 0.04 mg QGE/g extract ส่วนดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด คือ 24.10±0.02 mg QGE/g extract ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aisantia & Wongkrachang (2014) ที่ศึกษาระบบตัวทำละลายของการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากดอกดาวเรืองสด พบว่าดอกดาวเรืองสดที่สกัดด้วยระบบ 60% H_2O/EtOH มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด ซึ่งสารฟลาโวนอยด์จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มของสารประกอบ

ฟีนอลิกที่พบได้มากในพืช โดยสารฟลาโวนอยด์สามารถจับกับโลหะหนัก เช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} ที่มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย

4. ผลการทดสอบหาปริมาณแคโรทีนอยด์จากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

จากการทดสอบหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วย 3 วิธี และตัวทำละลาย 3 ชนิด ช่วงความยาวคลื่นที่ 452 นาโนเมตร พบว่าดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95% มีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 103.95 mg/g extract รองลงมาคือสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยโดยเอทานอล 50% คือ 0.715 mg/g extract ส่วนดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณน้อยที่สุด เท่ากับ 0.638 mg/g extract ตามลำดับ ดังแสดงตารางที่ 2 การศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากงานวิจัยของ Chompoo et al. (2021) ที่ศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส พบว่าที่สารสกัดด้วยน้ำจากดาวเรืองฝรั่งเศส มีปริมาณสารแคโรทีนอยด์ มีค่าระหว่าง 63.42±4.55 -128.60±5.94 mg/g DW ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดน้ำมีค่าเท่ากับ 0.638 ± 0.00 mg/g extract ในขณะที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ 103.95 ± 0.00 mg/g extract และสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95% มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าการสกัดด้วยการแช่ยุ่ยโดยเอทานอล 50% ถึง 145 เท่า คาดว่าอาจเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดแซนโทฟิลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว (Niyomdecha & Khongsen, 2013) ดังนั้นการสกัดด้วยเอทานอล 95% จึงพบปริมาณ แคโรทีนอยด์ที่มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล 50% อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ แสดงเป็นค่าที่ได้แทนในสูตรของแคโรทีนเท่านั้น ไม่ได้จำเพาะเจาะจงกับแคโรทีนอยด์ชนิดใดชนิดหนึ่ง จึงควรทำการศึกษาต่อโดยวิธีอื่นๆ ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น อาทิเช่น HPLC สำหรับใช้ในการวิเคราะห์

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์

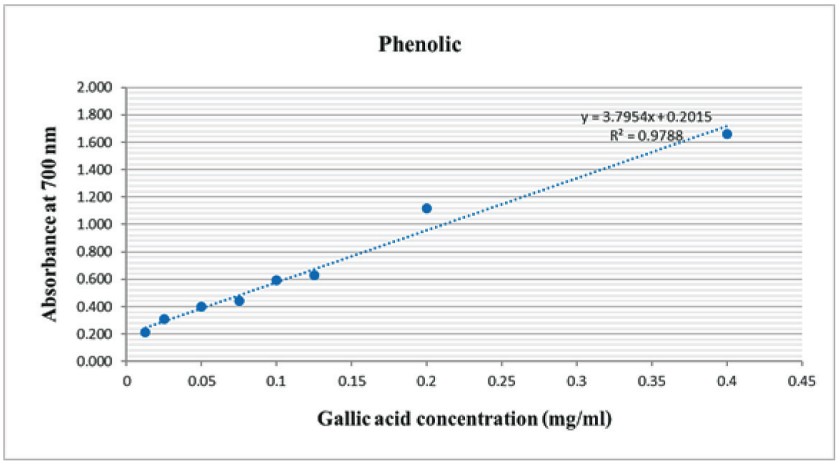
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งการคำนวณใช้สมการของกราฟมาตรฐาน โทรลอกซ์ ($y = 207.3X + 8.4735$, $R^2=0.9919$) ดังแสดงในภาพที่ 3 ผลการทดลองพบว่าดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยวิธีซอกห์เลตโดยใช้เอทานอล 95% แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือการสกัดด้วยน้ำ และการสกัดด้วยการแช่ยุ่ยโดยใช้เอทานอล 50% ซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 0.45±0.00, 0.51± 0.01 และ 0.50±0.01 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.40±0.00 µg/ml พบว่าดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.45 ± 0.00 µg/ml เนื่องจากเอทานอล 95% ให้ปริมาณฟีนอลิกสูง จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย ในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบนั้นอาจมาจากสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ingkasupart et al. (2015) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณ ลูทีนของดาวเรือง 11 สายพันธุ์ในประเทศไทย โดยสกัดสารจากดอกดาวเรืองด้วยเอทานอล 95% พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้จึงกล่าวได้ว่าสารสกัดจากส่วนของดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอนหรือเป็นสารให้ไฮโดรเจนและกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Singsai et al., 2020) โดยหมู่ฟีนอลจะสามารถรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระและกลายเป็นอนุมูลของสารประกอบ

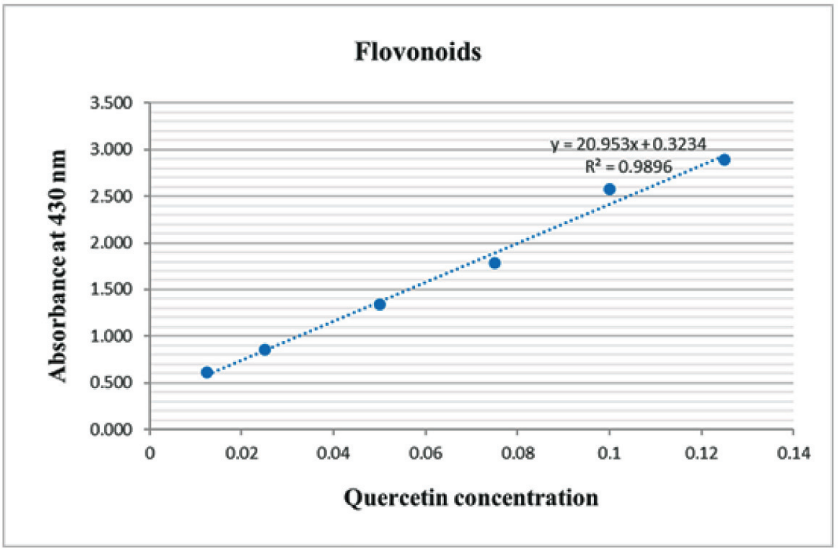
ฟีนอลที่เสถียรซึ่งทำลายวงจรของความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pourmorad et al. (2006) และ Buachoon & Manjit (2018) ที่พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงด้วย

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม แคโรทีนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี และตัวทำละลาย 3 ชนิด

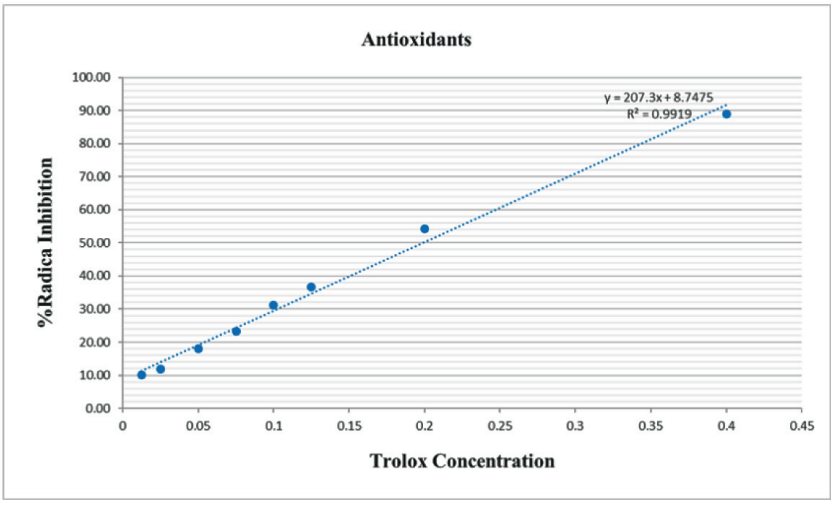
วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	Phenolics (mg GAE/g extract)	Flavonoids (mg QGE/g extract)	Carotenoids (mg/g extract)	Antioxidant activity (IC_{50} ± S.D. (mg/ml))
Decoction	น้ำกลั่น	63.90 ± 0.06	24.10 ± 0.02	0.638 ± 0.01	0.50 ± 0.01
Maceration	เอทานอล 50%	58.70 ± 0.02	174.30 ± 0.07	0.715 ± 0.04	0.51 ± 0.01
Soxhlet extractor	เอทานอล 95%	63.90 ± 0.01	100.30 ± 0.04	103.95 ± 0.03	0.45 ± 0.02



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

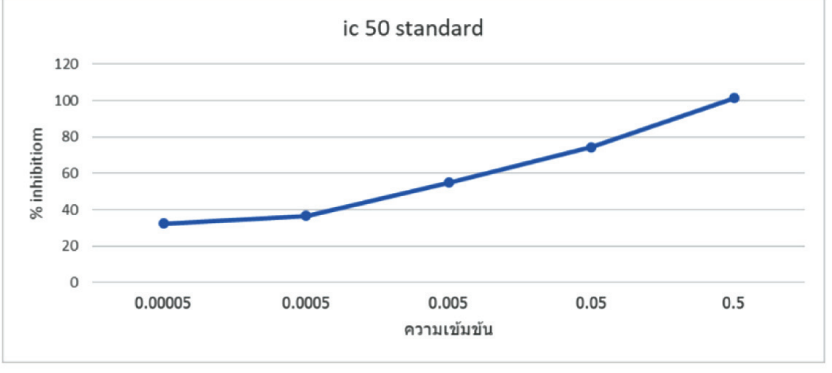
6. ผลการทดสอบการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนในระดับหลอดทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ ในระดับหลอดทดลอง ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้ ยา Diclofenac เป็นสารมาตรฐาน Standard Difelene IC_{50} (mg/ml) ดังแสดงในภาพที่ 4 จากการศึกษาสารสกัดจากดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วย 3 วิธีร่วมกับตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สกัดด้วยน้ำ เอทานอล 50% และ เอทานอล 95% พบว่าการสกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำมีฤทธิ์การต้านการอักเสบได้ดีที่สุด

อยู่ที่ 74.64% ที่ความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการต้านการอักเสบคือ 0.1 mg/ml รองลงมาคือ การสกัดด้วยวิธีซอกห์เลต โดยใช้เอทานอล 95% อยู่ที่ 54.30% ที่ความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการต้านการอักเสบคือ 0.1 mg/ml ในส่วนของการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล 50% ให้ค่าที่ต่ำที่สุดอยู่ที่ 38.67% ที่ความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการต้านการอักเสบคือ 0.1 mg/ml ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนในระดับหลอดทดลองของสารสกัดจากดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี และตัวทำละลาย 3 ชนิด

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนสภาพของโปรตีน (% inhibition)		
	วิธีต้มด้วยน้ำกลั่น	วิธีแช่ยุ่ยด้วยเอทานอล 50%	วิธีซอกห์เลตด้วยเอทานอล 95%
ดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์	74.64 %	38.67 %	54.30 %



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐาน Standard Difelene IC_{50} (mg/ml)

สรุป

จากการศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีนของสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยวิธีการสกัด 3 แบบโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ น้ำ เอทานอล 50% และเอทานอล 95% พบว่าปริมาณสารสำคัญของสารสกัดเอทานอล 50% เอทานอล 95% และน้ำ พบในปริมาณที่แตกต่างกันทางสถิติ การสกัดดอกดาวเรืองร็อคโค่ดีฟโกลด์ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ด้วยวิธีซอกห์เลต มีปริมาณสารประกอบปฟีนอลิกรวมแคโรทีนอยด์มากที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% ด้วยวิธีแช่ยุ่ย ได้ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด และการสกัดด้วยน้ำ

ด้วยวิธีต้มมีฤทธิ์ต้านการอักเสบมากที่สุด โดยเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลองโดยวัดความสามารถในการยับยั้งการเสียสภาพโปรตีน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี ร่วมกับการใช้วิธีการอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นทางกายภาพหรือเคมีเพื่อจะได้สารสำคัญปริมาณมากที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มมูลค่าให้ดอกดาวเรืองพันธุ์ร็อคโค่ดีฟโกลด์ และนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอางหรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์เอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือสำหรับ ทำวิจัย และขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยโภชนาการ ศูนย์วิจัยโรคไม่ติดเชื้อและอนามัยสิ่งแวดล้อม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่เพื่อใช้ในการทำวิจัย ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ ที่เสียสละเวลาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

เอกสารอ้างอิง

Aisantia. O., & Wongkrachang, K. (2014). The Investigation of the Extraction Solvent System of Total Phenolics and Flavonoids–Rich Extracts and Antioxidant Activity from *Tagetes erecta* Flower. **Science and Technology Nakhon Sawan Rajabhat University Journal, 7**(7), 29-40. (In Thai)

Buachoon, N., & Manjit, W. (2018). Quantitation of Total Phenolics Antioxidant Activity and Development of skin care lotions. **VRU Research and Development Journal Science and Technology, 13**(2), 86-97. (In Thai)

Burlec, A.F., Cioanca, O., Mircea, C., Arsene, C., Tuchiluş, C., Corciovă, A., & Hăncianu, M. (2019). Antioxidant and antimicrobial properties of Chrysanthemum and Tagetes selective extracts. **Farmacia, 67**, 405–410.

Chompoo, J., U-yatung, S., Kaiput, T., & Boonruangrod, R. (2021). Phytochemical Contents and Antioxidants Activity of Extracts from French Marigold Flowers (*Tagetes patula* L.). **King Mongkut's Agricultural Journal, 39**(4), 264-273.

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, **73**, 627-650.

Ingkasupart, P., Manochai, B., Song, W.T., & Hong, J.H. (2015). Antioxidant activities and lutein content of 11 marigold cultivars (*Tagetes* spp.) grown in Thailand. **Food Science and Technology (Campinas)**, **35**(2), 380-385. (In Thai)

Isantea, O., & Wongkrajang, K. 2015. The Investigation of the Extraction Solvent System of Total Phenolics and Flavonoids–Rich Extracts and Antioxidant Activity from Tagetes erecta Flower. **Science and Technology Nakhon Sawan Rajabhat University Journal, 7**(7), 29-41. (In Thai)

Kaisoon, O., Konczak, I., & Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. **Food Research International, 46** 563–571.

Karwani, G., & Sisodia, S.S. (2015). *Tagetes erecta* plant: Review with significant pharmacological activities. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, **3**(6), 1180-1183.

Niyomdecha. A., & Khongsen. M. (2013). Metabolism and Nutritional Values of Carotenoids on Egg Yolk Color. **Princess of Naradhiwas University Journal, 5**(4), 112-121. (In Thai)

Pietta, P.G. (2000). Flavonoidsasantioxidants. **Journal of Natural Products, 63**, 1035-1042.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, **5**(11), 1142-1145. (In Thai)

Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Jetiyanon, K., Wittaya-areekul, S. & Ingkaninan, K. (2007). Comparison of various extraction methods of *Bacupa monnieri*. **Naresuan University Journal, 15(**1), 29-34.

Pérez-Ortega, G., Angeles-López, G.E., Argueta-Villamar, A., & González-Trujano, M.E. (2017). Preclinical evidence of the anxiolytic and sedative-like activities of *Tagetes erecta* L. reinforces its ethnobotanical approach. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, **93** (Supplement C), 383-390.

Ranganna, S. (1999). **Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products**. New Delhi.Tata Mc-Graw Hill publishing company Ltd.

Saani, M., Lawrence, R., & Lawrence, K. (2017). Evaluation of pigments from methanolic extract of *Tagetes erecta* and Beta vulgaris as antioxidant and antibacterial agent. **Natural Product Research, 11**, 1-4.

Singsai, K., Sakdavirote, A., Wechpanishkitkul, K., & Moonsamai, A. (2020). The comparison of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activities of the ethanolic extracts of shoots, leaves, fruits and seeds of *Leucaena leucocephala*. **Naresuan Phayao Journal, 13**(3), 66-73. (In Thai)

Williams, L.A., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J.A. (2008). The in vitro antidenaturation effects induced by natural products and nonsteroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of antiinflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. **West Indian Medical Journal**, **57**(4), 327-331.

Wang, W., Xu, H., Chen, H., Tai, K., Liu, F., & Gao, Y. (2016). In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetaget in extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. **Journal of Food Science and Technology, 53**(6), 2614-2624.

Wongkrajang, K., & Jankam, A. 2017. The Effect of Ethanol Extract of *Tagetes erecta* Flowers on Lettuce Growth. **Science and Technology Nakhon Sawan Rajabhat University Journal, 9**(9), 97-111. (In Thai)

Xu, L. W., Chen J., Huan, H. Y., & Shi, Y. P. (2012). Phytochemicals and their biological activities of plants in Tagetes. **Journal Chinese Herbal Medicines**, **4**(2), 103-117.

Yen, G.C., & Hsieh, C.L. (1997). Antioxidant effects of dopamine and related compounds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61**(10), 1646–1649.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry, 64**, 555-559.