ปริมาณสารพฤกษเคมี และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส

Phytochemical Contents and Antioxidants Activity of Extracts from French Marigold Flowers (*Tagetes patula* L.)

จำเนียร ชมภู[1*] สุนิสา อุยะตุง[1] ธนพงศ์ ไกรพุฒ[1] และราตรี บุญเรืองรอด[2]
Jamnian Chompoo[1*], Sunisa U-yatung[1], Tanapong Kaiput[1] and Ratri Boonruangrod[2]

บทคัดย่อ

ดาวเรืองฝรั่งเศสจัดเป็นไม้ประดับพุ่มเตี้ย มีกลีบดอกหลากหลายสี ซึ่งดาวเรืองบางชนิดมีรายงานสรรพคุณทางเภสัชวิทยา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี และทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส 10 พันธุ์ ได้แก่ KPS01-SY, KPS02-SO, KPS03-SO, KPS04-DO, KPS05-DY, KPS06-SR, KPS07-SY, KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR ผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR มีปริมาณสาร flavonoids และ phenolics สูงกว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์อื่น นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO และ KPS09-DY มีปริมาณสาร carotenoids สูง เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา DPPH radical scavenging พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 64.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนการยับยั้งปฏิกิริยา ABTS radical scavenging พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองทุกพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (IC_{50} อยู่ในช่วง 27.09 ถึง 29.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าสาร BHT (IC_{50} เท่ากับ 57.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY, KPS03-SO และ KPS04-DO มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา PMS-NADPH radical scavenging ได้ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 165.30, 131.96 และ 148.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging ได้ (IC_{50} เท่ากับ 587.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS09-DY และ KPS10-DR มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ของ LDL ได้ดี (IC_{50} เท่ากับ 234.93 และ 232.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

คำสำคัญ: ดาวเรืองฝรั่งเศส ต้านอนุมูลอิสระ สารพฤกษเคมี สารสกัดด้วยน้ำ

Abstract

French marigolds (*Tagetes patula* L.) are classified as ornamental shrubs that various colors of flower were found. Pharmacological properties have been reported in some species of marigolds. The objectives of this study were to analyze phytochemical content and to investigate the antioxidant performance of water extracts from 10 species of French marigold flowers (viz. KPS01-SY, KPS02-SO, KPS03-SO, KPS04-DO, KPS05-DY, KPS06-SR, KPS07-SY, KPS08-DO, KPS09-DY and KPS10-DR). The results showed that water extracts of flowers from KPS08-DO, KPS09-DY and KPS10-DR contained higher content of flavonoids and phenolics than the other extracts. Moreover, water extracts of flowers from KPS08-DO and KPS09-DY also contained high levels of carotenoids. In regard to the antioxidant property of DPPH radical scavenging, extracts of flowers from KPS08-DO showed stronger inhibition effect than other extracts (IC_{50} = 64.51 μg/mL). For inhibition of ABTS radical scavenging, all water extracts showed strong inhibitory effect (IC_{50} value between 27.09 to 29.38 μg/mL), moreover, they showed stronger inhibitory effect than BHT (IC_{50} = 57.48 μg/mL). Water extracts of flowers from KPS01-SY, KPS03-SO and KPS04-DO performed highly on inhibition of PMS-NADPH radical scavenging (IC_{50} = 165.30, 131.96 and 148.33 μg/mL, respectively). In regard to nitric oxide radical scavenging inhibition, water flower extracts of KPS01-SY

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
[1] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140
[2] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140
*Corresponding author, E-mail: agrjnc@ku.ac.th

showed high inhibitory effect (IC_{50} = 587.56 µg/mL). Water extracts of flowers from KPS09-DY and KPS10-DR had inhibitory effect on oxidation of LDL (234.93 and 232.08 µg/mL, respectively).

Keywords: French marigold, antioxidant, phytochemical, water extract

คำนำ

ความเสื่อมสภาพของเซลล์ร่างกายมนุษย์มีความสัมพันธ์กับการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ภายในร่างกาย (Liu, 2020) ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง และเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ร่างกายเสียสภาพ และนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ (Adwas et al., 2019) โดยที่ร่างกายมนุษย์จะมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation และกำจัดอนุมูลอิสระที่จะเกิดขึ้น แต่ร่างกายสามารถผลิตได้ในปริมาณน้อยจึงจำเป็นต้องรับเพิ่มจากภายนอก จากการรับประทานอาหาร (Xu et al., 2017) จากการวิจัยทางเภสัชวิทยารายงานว่า ภายในพืชตามธรรมชาติอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมี (phytochemical) เช่น สารประกอบกลุ่ม phenolics และ flavonoids ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Ghasemzadeh et al., 2010)

ดาวเรืองฝรั่งเศส (French marigold) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tagetes patula* L. เป็นดาวเรืองชนิดพุ่มเตี้ย ดอกมีทั้งกลีบดอกเรียงชั้นเดียวและซ้อนกันหลายชั้น มีขนาดดอกเล็กสีเหลือง ส้ม ทอง น้ำตาลอมแดง และสีแดง (ภูริพันธุ์ สุวรรณเมฆ, 2559) ดาวเรืองเป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานสรรพคุณทางเภสัชวิทยาในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ยาต้านการอักเสบ ต้านเชื้อรา ต่อต้านพยาธิ และช่วยรักษาบาดแผล เนื่องจากภายในสารสกัดจากดอกดาวเรืองประกอบไปด้วยสารสำคัญต่าง ๆ เช่น สารกลุ่ม flavonoids, polyphenols, saponosides, organic acids และ sacharides อีกทั้งยังพบสาร carotenoid ในปริมาณสูง (Benko et al., 2019) Akshaya et al. (2016) พบว่าสารแคโรทีนอยด์ เป็นหนึ่งในสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยความแตกต่างของประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสรรพคุณทางยาขึ้นอยู่กับชนิดของดาวเรือง ส่วน Jobi (2016) พบว่าสาร lutein ในสารสกัดจากดาวเรือง *Tagetes patula* มีบทบาทในการต้านจุลชีพได้มากกว่า *Tagetes erecta* ซึ่งสาร lutein เป็นพวก carotenoids ในกลุ่ม xanthophylls มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล โดยทั่วไปสารชนิดนี้จะอยู่ในรูปแบบของกรดไขมันลูทีนเอสเทอร์ และส่วนดอกของดาวเรืองจัดเป็นแหล่งของสารแคโรทีนอยด์ตามธรรมชาติ ได้แก่ แซนโทฟิล (lutein, zeaxanthin) และแคโรทีนอยด์สีเหลือง (β-carotenes) นอกจากนี้ Boonnoun et al. (2012) รายงานว่าสารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพมนุษย์ เช่น บำรุงสายตา บำรุงผิวหนัง ลดความเสื่อมของดวงตาที่เกิดจาก macular degeneration (AMD) โรคหลอดเลือดหัวใจ และมะเร็ง (Wang et al., 2016) ดาวเรืองเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนใหญ่เกิดจากความสามารถของ lutein ซึ่งเป็นเม็ดสี xanthophyll ที่อยู่ภายในสารประกอบเคมีธรรมชาติของดอกดาวเรือง อีกทั้ง lutein มีคุณสมบัติหลักในการต้านเชื้อแบคทีเรีย larvicidal, nematocidal และสารต้านอนุมูลอิสระ พร้อมทั้งยังใช้เป็นสารแต่งสีอาหารที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (Priyanka et al., 2013) สารลูทีนในดาวเรืองจึงได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารและยารักษาโรค นอกจากนี้ จำเนียร ชมภู และคณะ (2562) พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO มีปริมาณสารพฤกษเคมีพวก phenolics, saponins และ tannins ปริมาณสูง อีกทั้งมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา DPPH และ ABTS radical scavenging และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α-glucosidase ได้สูงกว่าดาวเรืองอเมริกัน (พันธุ์ทองเฉลิม) และดาวเรืองพื้นเมือง (พันธุ์สีส้ม) การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี ประกอบด้วย flavonoids, phenolics และ carotenoids และทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, PMS-NADH system superoxide radical scavenging, nitric oxide radical scavenging และปฏิกิริยา oxidation ของ low density lipoprotein (LDL) รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบพฤกษเคมีกับการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาวเรือง จำนวน 10 พันธุ์

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างดอกดาวเรือง

การปลูกดาวเรือง

ทำการปลูกดาวเรืองฝรั่งเศสในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2562 จำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ KPS01-SY, KPS02-SO, KPS03-SO, KPS04-DO, KPS05-DY, KPS06-SR, KPS07-SY, KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR ในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว สูง 9 นิ้ว มีการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 รองก้นหลุมก่อนปลูก ปริมาตร 1 ช้อนชา หลังจากนั้น 2, 4 และ 6 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ปริมาตร 1 ช้อนชาต่อกระถาง รดน้ำตามสภาพอากาศในแต่ละวัน ตัดดอกดาวเรืองที่อายุประมาณ 60-80 วันหลังปลูก (Figure 1) ไปผึ่งในที่ร่ม อุณหภูมิห้องประมาณ 27-30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง บดตัวอย่างแห้งให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการทดลอง

Figure 1 Characteristic of flowers of French marigolds in this study.

การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรือง

นำผงบดดาวเรือง 1 กรัม ต้มในน้ำเดือด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที (Kao et al., 2014) หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ได้เป็นสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรือง ทำการเจือจางสารสกัดด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 200, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพฤกษเคมี

วิเคราะห์ปริมาณสาร flavonoids ตามวิธีของ Djeridane et al. (2006) หยดสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรือง ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย aluminium chloride (2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร) ด้วยเครื่อง microplate reader (รุ่น Multiskan Go, Thermo Scientific, MA, USA) คำนวณปริมาณสาร flavonoids เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ rutin equivalent (RUE) เมื่อ $Y = 0.0136x + 0.078$ ($R^2 = 0.998$) มีหน่วยเป็น mg RUE/ g DW

วิเคราะห์ปริมาณสาร phenolics ตามวิธีของ Kähkänen et al. (1999) นำสารสกัดด้วยน้ำจากดาวเรือง ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงใน 96-well plate เติม folin ciocalteau reagent (อัตราส่วน 1 : 1 ; reagent : water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดตัวอย่าง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และตามด้วย sodium carbonate (7.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณสาร phenolics เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid equivalent (GAE) เมื่อ $Y = 0.0014x + 0.069$ ($R^2 = 0.998$) มีหน่วยเป็น mg GAE/ g DW

วิเคราะห์ปริมาณของสาร carotenoids ดัดแปลงตามวิธีของ Ranganna (1999) ด้วยการแช่ผงบดดอกดาวเรือง 1 กรัม ในตัวทำละลาย acetone แช่เย็น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้ไปแยกชั้นด้วย petroleum ether ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณของ carotenoids จากสูตรดังนี้

$$\text{Total carotenoids} = \frac{3.87 \times A_{452} \times \text{volume make up} \times \text{dilution factor} \times 100}{\text{weight of sample (g)} \times 1000}$$

เมื่อ A_{452} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร

ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา DPPH radical scavenging ตามวิธีของ Boskou et al. (2006) นำสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ (ได้แก่ 10, 100, 200 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (0.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ sodium acetate buffer (0.1 โมลาร์, pH 5.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับน้ำ (ชุดควบคุม) โดยใช้ butylatedhydroxytoluene (BHT) เป็นสาร positive control

ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา ABTS radical scavenging ตามวิธีของ Hsu et al. (2011) เตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยการผสม potassium persulfate (2.45 มิลลิโมลาร์) กับ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammoniumsalte (ABTS) ใน phosphate buffer (0.1 โมลาร์, pH 7.4) นำไปไว้ที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลามากกว่า 16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา oxidation อย่างสมบูรณ์ ได้เป็นอนุมูลอิสระของ $ABTS^{\bullet+}$ หลังจากนั้นเจือจางด้วย phosphate buffer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.700±0.050 ใส่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้ง คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและสาร BHT

ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา PMS-NADH system superoxide-radical scavenging ตามวิธีของ Lau et al. (2002) ใส่สารผสมของ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (105 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ nitrobluetetrazolium (NBT) (66 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายใน phosphate buffer (0.1 โมลาร์, pH 7.4) และสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสาร phenazine methosulphate (PMS) (30 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและสาร BHT

ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging ตามวิธีของ Govindarajan et al. (2004) นำสารละลายผสมของ sodium nitroprusside (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กับ phosphate saline buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารสกัดดอกดาวเรืองความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย sulfanilic acid (0.3 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติมสาร *N*-(1-naphthy) ethyenediaminedihydrochloride (0.1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ้าสารสกัดตัวอย่างมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะทำให้สารละลายมีสีจางลง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ low density lipoprotein (LDL) ด้วยวิธีของ Rattan and Arad (1998) นำสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองและสาร curcumin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ LDL (222 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ copper sulfate (55 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม ethylenediaminetraacetic acid (EDTA) (1 โมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปวางในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ปฏิกิริยา oxidation ของ LDL ด้วย thiobarbituric acid (TBA) ตามวิธีของ Steinbrecher et al. (1984) เติมสารผสมของ TBA (0.67 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ trichloroacetic acid (TCA) (20 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที นำสารละลายใสส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบปฏิกิริยากับกราฟมาตรฐานของ malonyldialdehyde (MDA) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมของ MDA

คำนวณประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)} = [(OD_{\text{ชุดควบคุม}} - OD_{\text{ตัวอย่าง}})/ \text{OD ชุดควบคุม}] \times 100$$

เมื่อ $OD_{\text{ชุดควบคุม}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำ (ชุดควบคุม)

$OD_{\text{ตัวอย่าง}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง และ positive control

คำนวณค่าความเข้มข้นของสารนั้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (the half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) จากสมการเส้นตรงของค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดระดับต่าง ๆ ดังสมการต่อไปนี้

$$Y = mx+c$$

เมื่อ Y คือ ประสิทธิภาพในการยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์

x คือ ความเข้มข้นของสารนั้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) สิ่งทดลอง คือ สารสกัดจากดอกดาวเรือง 10 พันธุ์ ทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.01$) และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (R) ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมี และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระแบบเพียร์สัน (Pearson product-moment correlation) ด้วยโปรแกรม SPSS (IBM SPSS statistic version 15 for windows)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ปริมาณสารพฤกษเคมี

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี 3 กลุ่ม ได้แก่ flavonoids, phenolics และ carotenoids ในสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองแต่ละพันธุ์ พบว่า ดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR มีปริมาณของสาร flavonoids และ phenolics สูง (มีปริมาณเท่ากับ 132.70±1.95, 136.80±9.46, 125.21±11.63 mg RUE/g DW และ 697.03±26.94, 672.38±14.89, 687.86±16.83 mg GAE/g DW ตามลำดับ) มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ในขณะที่ดอกของดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO และ KPS09-DY มีปริมาณของสาร carotenoids มากกว่าพันธุ์อื่นแตกต่างทางสถิติ (มีปริมาณเท่ากับ 125.47±5.34 และ 128.60±5.94 mg/g DW) (Table 1)

Table 1 The contents of flavonoids, phenolics and carotenoids of water extracts from French marigold flowers.

French marigold species	Flavonoids (mg RUE/g DW)	Phenolics (mg GAE/g DW)	Carotenoids (mg/g DW)
KPS01-SY	54.39±1.26 d[1/]	428.45±9.29 de	63.42±4.55 b
KP02-SO	119.15±8.07 ab	588.10±7.91 bc	92.48±9.26 ab
KPS03-SO	94.32±4.23 bc	510.36±14.60 cd	66.93±5.84 b
KPS04-DO	59.33±1.51 d	490.95±20.05 de	95.82±4.74 ab
KPS05-DY	51.36±1.33 d	411.31±7.74 e	95.98±8.21 ab
KPS06-SR	118.62±3.53 ab	604.29±18.82 ab	104.77±2.70 ab
KPS07-SY	72.09±2.39 cd	475.60±17.16 de	98.75±8.78 ab
KPS08-DO	132.70±1.95 a	697.03±26.94 a	125.47±5.34 a
KPS09-DY	136.80±9.46 a	672.38±14.89 ab	128.60±5.94 a
KPS10-DR	125.21±11.63 a	687.86±16.83 a	71.60±7.54 b

[1/] The data represent the mean±SD of six replications.

Values followed by the same letters within each column are not significantly different according to Duncan's New Multiple Range Test ($P \leq 0.01$).

ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา DPPH radical scavenging ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) (Figure 2A) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของ DPPH$^{\bullet}$ ได้ดี (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 64.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสาร BHT (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 42.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองในการยับยั้งปฏิกิริยา ABTS radical scavenging นั้น พบว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสทุกพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของ ABTS$^{\bullet}$ ซึ่งมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 27.09 ถึง 29.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาร BHT แตกต่างกันทางสถิติ (ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Figure 2B) สำหรับประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งปฏิกิริยา PMS-NADPH radical scavenging (Figure 2C) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระของ superoxide radicals ($O_2^{-\bullet}$) ได้ไม่ดีมากนัก ซึ่งมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 288.67 ถึง 418.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY, KPS03-SO และ KPS04-DO มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ $O_2^{-\bullet}$ ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์อื่น ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 165.30, 131.96 และ 148.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PMS-NADPH radical scavenging ได้ต่ำ แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสาร BHT (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging (Figure 2D) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสทุกพันธุ์มีประสิทธิภาพต่ำในการต้านอนุมูลอิสระของ NO$^{\bullet}$ มีค่า IC_{50} มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อยู่ในช่วง 587.56 ถึง 4131.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสาร BHT ในการต้านอนุมูลอิสระในปฏิกิริยานี้ (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

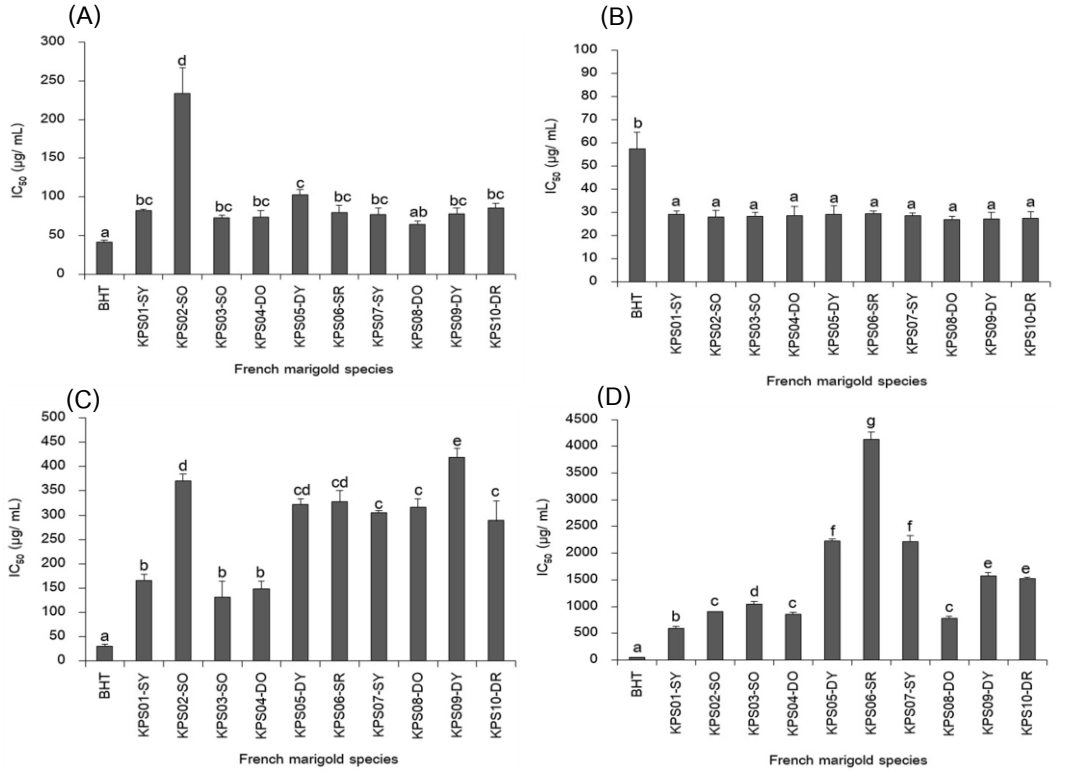

Figure 2 The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of water extracts from French marigold flowers on DPPH (A), ABTS (B), PMS-NADH (C) and nitric oxide (D) radical scavenging radicals.

สำหรับการศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ LDL พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากดาวเรืองพันธุ์ KPS03-SO, KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์อื่น โดยที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 285.21, 289.10, 234.93 และ 232.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองทุกพันธุ์มีประสิทธิภาพต่ำกว่าสาร curcumin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีรายงานประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ LDL ได้ดี (Mahfouz et al., 2009) (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Figure 3)

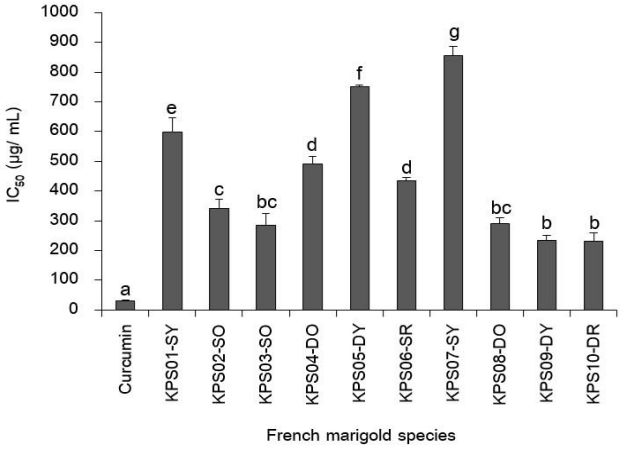

Figure 3 The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of water extracts from French marigold flowers on oxidation of LDL.

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส (Table 2) พบว่าปริมาณสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดที่ทำการทดสอบ ได้แก่ flavonoids, phenolics และ carotenoids มีค่าสหสัมพันธ์ หรือ R เป็นบวกต่อกัน นั่นคือ เมื่อปริมาณของสารชนิดใดชนิดหนึ่งเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณของสารอีกสองชนิดเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ปริมาณของสาร carotenoids มีความสัมพันธ์เป็นบวกกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา DPPH มีค่า R เท่ากับ 0.602 แสดงว่าปริมาณของสาร carotenoids เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของ $DPPH^{\bullet}$ ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของสาร flavonoids, phenolics และ carotenoids มีค่า R เท่ากับ 0.583, 0.511 และ 0.747 กับการเกิดปฏิกิริยา PMS-NADH ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณของสาร flavonoids และ phenolics มีค่าสหสัมพันธ์เป็นลบในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ค่า R เท่ากับ -0.769 และ -0.764 ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณของสารทั้งสองชนิดนี้เพิ่มขึ้น จะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ LDL ลดลง ซึ่ง Vaya et al. (2003) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของสาร flavonoids ในการยับยั้งปฏิกิริยา LDL oxidation พบว่า สาร flavonoids ได้แก่ catechol ไม่มีผลในการยับยั้งปฏิกิริยานี้ โดยที่ Rahman et al. (2015) รายงานว่า สารกลุ่ม polyphenolics สามารถทำลายโครงสร้างของอนุมูลอิสระได้ และยังสามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา LDL oxidation นอกจากนี้ Riemersma et al. (2001) ยังรายงานว่า สารประกอบ phenolics สามารถให้ H หรือเป็นสารเชิงซ้อนคีเลต (chelate metal ion) ที่มีพันธะโคออร์ดิเนชันอย่างน้อย 2 พันธะ สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง phenolics กับฤทธิ์ต่ออนุมูลอิสระยังมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง ซึ่งอาจพบว่า สาร phenolics บางชนิดสามารถทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลดลง เนื่องจากความซับซ้อนของสารประกอบทางเคมีในพืช จึงมีความแตกต่างกันในการเกิดคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Zheng and Wang, 2001)

จากการเลือกทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยที่ $DPPH^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงที่ ส่วน $ABTS^{\bullet+}$ เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้ H-atom ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซี (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) นอกจากนี้ nitric oxide radical ($NO^{\bullet}$) ซึ่งจัดเป็นอนุมูลอิสระที่สร้างจากเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) สามารถพบได้ในเซลล์ macrophage ที่อยู่รอบก้อนมะเร็ง ส่วนผลผลิตของ

อนุมูลอิสระจากกระบวนการ lipid peroxidation อย่างเช่น MDA จะสามารถทำปฏิกิริยากับ DNA แล้วทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือก่อให้เกิดมะเร็งได้ (โกสินทร์ วิระษร และคณะ, 2557) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองทั้ง 5 วิธี จะเห็นได้ว่า สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดี ซึ่ง Koldas et al. (2015) และ Koyuncu (2018) พบว่า ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ พบได้ในระบบตัวทำละลายที่เป็นน้ำ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท อีกทั้งยังพบปริมาณรวมของสาร phenolics, flavonoids และ carotenoids ในระดับที่สูง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ทำให้โครงสร้างของอนุมูลอิสระเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (Pietta, 2000) นอกจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากการทดลองนี้แล้ว ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งด้วยการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา autooxidation ในเซลล์ไขมัน (Zheng and Wang, 2001) อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็ง โดยที่สารต้านอนุมูลอิสระเป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่สามารถช่วยป้องกันเซลล์จากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ (โกสินทร์ วิระษร และคณะ, 2557)

Table 2 Correlations between phytochemical contents and antioxidant properties of water extracts from French marigold flowers.

	FLA	PHE	CAR	DPPH	ABTS	PMS	NO	LDL
FLA	1.000							
PHE	0.995**	1.000						
CAR	0.535**	0.468**	1.000					
DPPH	0.175	0.048	0.602**	1.000				
ABTS	-0.128	-0.152	0.014	0.155	1.000			
PMS	0.583**	0.511**	0.747**	0.353	-0.008	1.000		
NO	0.109	0.036	0.019	-0.147	0.202	0.384*	1.000	
LDL	-0.769**	-0.764**	-0.212	-0.067	0.319	-0.105	0.257	1.000

*Significance level at P<0.05; ** significance level at P<0.01.
FLA = flavonoids; PHE = phenolics; CAR = carotenoids; DPPH = DPPH radical scavenging; ABTS = ABTS radical scavenging; NO = nitric oxide radical scavenging; LDL = oxidation of low density lipoproteins.

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO และ KPS09-DY มีปริมาณของสาร flavonoids, phenolics และ carotenoids ที่สูง โดยที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกของดาวเรืองทั้งสองพันธุ์นี้แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา DPPH, ABTS radical scavenging และ LDL oxidation ได้ดี ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกของดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา PMS-NADH และ nitric oxide radical scavenging ได้ดี สอดคล้องกับรายงานของ Nantitanon et al. (2010) ที่พบว่า นอกจากปริมาณของสารพฤกษเคมีที่สูงแล้วนั้นชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ก็มีผลในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช นอกจากนี้ ศุกฤชชญา เหมะธุลิน และสุชีลา เตชะวงศ์เสถียร (2559) ยังพบว่าสายพันธุ์ของพืชมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของมะเขือเทศราชินี ดังนั้นการจำแนกชนิดของสารพฤกษเคมีในสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสแต่ละพันธุ์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ และการนำสารสกัดมาใช้ป้องกันหรือรักษาโรคที่เฉพาะเจาะจง จึงควรมีการศึกษาและทดสอบสรรพคุณทางยาในการช่วยป้องกันโรคเฉพาะทางต่อไป

สรุปผลการศึกษา

สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR มีสารพฤกษเคมีพวก phenolics, flavonoids และ carotenoids ปริมาณสูง โดยที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR นี้ สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา DPPH radical scavenging และ LDL oxidation ได้ดี ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PMS-NADH และ nitric oxide radical scavenging ได้ดี นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสทั้ง 10 พันธุ์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของ ABTS ได้ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับสาร BHT

เอกสารอ้างอิง

โกสินทร์ วิระษร, กุลธิดา กล้ารอด, ประณิธิ หงส์ประภาส และพัชรี บุญศิริ. 2557. ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลและสารต้านออกซิเดชันกับโรคมะเร็ง. *ศรีนครินทร์เวชสาร* 29(2): 207-219.

จำเนียร ชมภู, เชษฐ์ชัชชัยย์ นิลาภรณ์, จุฑามาศ เมรสนัด และราตรี บุญเรืองรอด. 2562. ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และ แอลฟา-กลูโคซิเดส. *แก่นเกษตร* 47(2): 293-306.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 21(3): 275-286.

ภูริพันธุ์ สุวรรณเมฆ. 2559. ดาวเรือง ดอกไม้แห่งความรุ่งเรือง. *เกษตรก้าวหน้า* 29(3): 70-77.

ศุกฤชชญา เหมะธุลิน และสุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. 2559. ผลของสายพันธุ์ต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของมะเขือเทศราชินี. *แก่นเกษตร* 44(ฉบับพิเศษ 1): 181-185.

Adwas, A. A., Elsayed, A. S., lAzab, A. E., and Quwaydir, F. A. 2019. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Biotechnology* 6(1): 43-47.

Akshaya, H. R., Banyal, N. , Singh, K. P., Saha, S., Panwar, S., and Bharadwaj, C. 2016. Determination and correlation of carotenoid pigments and their antioxidant activities in marigold (*Tagetes* sp.) flowers. *Indian Journal of Agricultural Science* 87(3): 390-396.

Benko, F., Palkovičová, V., Ďuračka, M., Árvay, J., Lukáč, N., and Tvrdč, E. 2019. *Antioxidant effects of marigold* (*Calendula officinalis) flower extract on the oxidative balance of bovine spermatozoa. Contemporary Agriculture* 68(3-4): 92-102.

Boonnoun, P., Opaskonkun, T., Prasitchoke, P., Goto, M., and Shotipruk, A. 2012. Purification of free lutein from marigold flower by liquid chromatography. *Engineering Journal* 16(5): 26-27.

Boskou, G., Salta, F. N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., and Andrikopoulos, N. K. 2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry* 94(4): 558-564.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolics. *Food Chemistry* 97(4): 654-660.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., and Rahmat, A. 2010. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules* 15(6): 4324-4333.

Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Rao, C. V., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S., and Pushpangadan, P. 2004. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia. Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27(8): 1266-1269.

Hsu, C. F., Peng, H., Basle, C., Travas-Sejdic, J., and Kilmartin, P. A. 2011. $ABTS^{\bullet+}$ scavenging activity of polypyrrole, polyaniline and poly (3,4-ethylenedioxythiophene). *Society of Chemical Industry* 60(1): 69-77.

Jobi, X. 2016. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Tagetes erecta* L and *Tagetes patula* L. Department of Life Sciences, Christ University.

Kähkänen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10): 3954-3962.

Kao, F. J., Chiu, Y. S., and Chiang, W. D. 2014. Effect of water cooking on antioxidant capacity of carotenoid-rich vegetables in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis* 22(2): 202-209.

Koldas, S., Demirtas, I., Ozen, T., Demirci, M. A., and Behcet, L. 2015. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *Viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(4): 786-798.

Koyuncu, I. 2018. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cellular and Molecular Biology* 64(3): 25-34.

Lau, K. M., He, Z. D., Dong, H., Fung, K. P., and But, P. P. H. 2002. Anti-oxidative, anti-inflammatory and hepato-protective effects of *Ligustrum robustum. Journal of Ethnopharmacology* 83(1-2): 63-71.

Liu, Z. Q. 2020. Bridging free radical chemistry with drug discovery: a promising way for finding novel drugs efficiently. *European Journal of Medicinal Chemistry* 189: 112020.

Mahfouz, M. M., Zhou, S. Q., and Kummerow, F. A. 2009. Curcumin prevents the oxidation and lipid modification of LDL and its inhibition of prostacyclin generation by endothelial cells in culture. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 90(1-2): 13-20.

Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., and Okonogi, S. 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *Food Science and Technology* 43(7): 1095-1103.

Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-1042.

Priyanka, D., Tripathi, S., and Verma, K. N. 2013. A brief study on marigold (*Tagetes erecta*): a review. *International Research Journal of Pharmacy* 4(1): 26-27.

Rahman, M. A., Abdullah, N., and Aminudin, N. 2015. Antioxidative effects and inhibition of human low density lipoprotein oxidation *in vitro* of polyphenolic compounds in *Flammulina velutipes* (golden needle mushroom). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015: 403023.

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

Rattan, A. K., and Arad, Y. 1998. Inhibition of LDL oxidation by new estradiol receptor modulator compounds LY-139478, comparative effect with other steroids. *Atherosclerosis* 136(2): 305-314.

Riemersma, R. A., Rice-Evans, C. A., Tyrrell, R. M., Clifford, M. N., and Lean, M. E. J. 2001. Tea flavonoids and cardiovascular health. *An International Journal of Medicine* 94(5): 277-282.

Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., and Steinberg, D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoproteein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(2): 3883-3887.

Vaya, J., Mahmood, S., Goldblum, A., Aviram, M., Volkova, N., Shaalan, A., Musa, R., and Tamir, S. 2003. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry* 62(1): 89-99.

Wang, W., Xu, H., Chen, H., Tai, K., Liu, F., and Gao, Y. 2016. *In vitro* antioxidant, antidiabetic and antilipemic potentials of quercetagetin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.). *Journal of Food Science and Technology* 53(6): 2614-2624.

Xu, D. P, Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., and Li, H. B. 2017. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences* 18(1): 96-128.

Zheng, W., and Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11): 5165-5170.

วันรับบทความ (Received date) : 15 ธ.ค. 63

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 28 ก.ค. 64

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 6 ต.ค. 64