ผลของวิธีการผลิตชาดอกบัวหลวงแดงต่อปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

Effect of Production Techniques of *Nelumbo Nucifera* Gaertn. Petal Tea on Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity

ยลดา ศรีเศรษฐ์[1] ปภาภัสสร์ ธีระพัฒนวงศ์[2] ชลิตา กุดวงค์แก้ว[1] ภานิชา พงศ์นราทร[1] จรินยา ขุนทะวาด[1] และ วรินท์ โอนอ่อน[1*]

Yollada Sriset[1] Paphaphat Thiraphatthanavong[2] Chalita Kudvongkaew[1] Panicha Pongnaratorn[1] Jarinya Khoontawad[1] and Warin Ohn-on[1*]

[1]สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สกลนคร 47160 ประเทศไทย

[2]สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี อุดรธานี 41000 ประเทศไทย

[1]Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon 47160, Thailand

[2]Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani 41000, Thailand

*E-mail: warin.oh@rmuti.ac.th

Received: Mar 08, 2024

Revised: Mar 24, 2024

Accepted: Apr 01, 2024

บทคัดย่อ

ภาวะความรู้คิดบกพร่องเล็กน้อยในผู้สูงอายุมักสัมพันธ์กับความเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งมีรายงานว่าเกิดจากการสะสมของอนุมูลอิสระ และการลดลงของอะซิติลโคลีน ด้วยเหตุนี้อาหารและเครื่องดื่มที่สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระ และบำรุงสมอง เช่น ชาสมุนไพร จึงได้รับความนิยมมากขึ้นเรื่อย ๆ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิธีการผลิตชาดอกบัวหลวงแดงต่อปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ผลิตภัณฑ์ชาที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จากวิธีการผลิต 3 วิธี ได้แก่ ชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (ชา NF) ชากึ่งหมัก (ชา SF) และชาที่หมักอย่างสมบูรณ์ (ชา CF) จากการศึกษาพบว่าชา CF มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เท่ากับ 8.77 ± 0.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของชาอบแห้ง ชา SF มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เท่ากับ 3.38 ± 0.12 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมของชาอบแห้ง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ แสดงให้เห็นว่าชา CF มีค่า half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ดีที่สุด เท่ากับ 1.89 ± 0.02 และ 0.15 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าชา CF มีค่า IC_{50} ดีที่สุด เท่ากับ 2.62 ± 0.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ชาดอกบัวหลวงแดง โดยเฉพาะชาที่หมักอย่างสมบูรณ์มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ผลิตภัณฑ์ชาดังกล่าวจึงมีศักยภาพที่จะนำไปต่อยอดในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ชาดอกบัวหลวงแดง ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Mild cognitive impairment in elderly people is generally associated with the degeneration of central nervous system which reportedly caused by oxidant accumulation and acetylcholine reduction. Therefore, healthy foods and beverages with antioxidant activity and brain nourishment, such as herbal tea, become

increasingly popular. This research aimed to examine effect of production techniques of *Nelumbo Nucifera* Gaertn. petal tea on total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory activity. Tea products used in this study were non-fermented tea (NF tea), semi-fermented tea (SF tea) and completely fermented tea (CF tea) which were obtained from 3 different production techniques. From the results, it was found that CF tea had the highest total phenolic content of 8.77 ± 0.21 mg gallic acid equivalent/g dry tea and SF tea had the highest total flavonoid content of 3.38 ± 0.12 mg quercetin equivalent/g dry tea. The study of antioxidant activity against $ABTS^{\bullet+}$ and $DPPH^{\bullet}$ demonstrated that CF tea had the best half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 1.89 ± 0.02 and 0.15 ± 0.01 mg/mL, respectively. In addition, from the study of acetylcholinesterase inhibitory activity, CF tea was found to have the best IC_{50} value of 2.62 ± 0.73 mg/mL. According to the abovementioned, *N. nucifera* petal tea products, especially the completely fermented tea, exhibited biological activity such as antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory activity. Therefore, the tea products have the potential to be commercialized in the future.

Keywords: *Nelumbo Nucifera* Gaertn. petal tea, Total phenolic content, Total flavonoid content, Acetylcholinesterase inhibitory activity, Antioxidant activity

1. บทนำ

ปัจจุบันประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น ข้อมูลจากการสำรวจจำนวนประชากรผู้สูงอายุของกรมการปกครอง กระทรวงมหาดไทย เมื่อปี 2566 พบว่า ประชากรผู้สูงอายุมีมากถึง 13 ล้านคน คิดเป็น 20.08% ของประชากรทั้งหมด [1] ในเอเชียแปซิฟิกพบว่า ปี 2563 มีประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไป ถึงร้อยละ13.6 ของประชากรทั้งหมด โดยภายในปี 2593 จะมีประชากรเพิ่มขึ้นถึงหนึ่งในสี่ [2] ความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้อายุประชากรเพิ่มมากขึ้น ในผู้สูงอายุพบว่าจะเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ลดลง รวมไปถึงการลดลงและเกิดความเสื่อมของเซลล์ประสาทในสมอง เกิดภาวะความรู้คิดบกพร่องเล็กน้อย (mild cognitive impairment) [3] โดยพบว่าประชากรสูงอายุในประเทศไทยมีจำนวนของภาวะความจำบกพร่องโดยเฉลี่ยร้อยละ 2 ถึง 10 ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำกิจวัตรประจำวันได้ [4]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในโรคกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับสมองและหลอดเลือด ส่งผลให้มีการลดลงของสารสื่อประสาทกลุ่มอะซิติลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งทำให้การเรียนรู้และความจำบกพร่องนั้น โดยเกิดจากกการทำงานของกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีประสิทธิภาพต่ำลง มีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (antioxidant) และในขณะเดียวกันเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (scavenger enzymes) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดลง นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ และเกิดความเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ส่งผลให้มีการทำลายเซลล์ประสาทและทำให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegeneration) [5] โดยเฉพาะสมองส่วนที่ควบคุมการเรียนรู้และการจำ ได้แก่ ฮิปโปแคมปัส (hippocampus) และ เปลือกสมองกลีบหน้าผากส่วนหน้า (prefrontal cortex) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการลดลงของการหลั่งสารสื่อประสาท (neurotransmitters) กลุ่มอะซิติลโคลีนจากเซลล์ประสาทกลุ่มโคลิเนอร์จิค (cholinergic neurons) ทำให้การเรียนรู้และความจำบกพร่อง [6]

ในทศวรรษที่ผ่านมา อาหารธรรมชาติที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารประกอบฟีนอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดโรคที่สืบเนื่องมาจากการเกิดออกซิเดชั่น (oxidation) [7] ปัจจุบันจึงมีผลิตภัณฑ์ที่ช่วยป้องกันและชะลอความเสื่อมของระบบต่าง ๆ เพื่อให้คุณภาพชีวิตดีขึ้น รวมทั้งการใช้ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพจากพืชสมุนไพร พบว่าชาสมุนไพร เป็นเครื่องดื่มที่มีประโยชน์และได้รับความนิยม ง่ายต่อการบริโภค ราคาไม่แพง และให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ ทำให้มูลค่าการตลาดผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในแต่ละปีค่อนข้างสูง และเป็นอีกทางเลือกที่ได้รับความสนใจมากขึ้น

บัวหลวงแดง หรือชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Nelumbo nucifer*a Gaertn มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการแพทย์ทางเลือกของหลายประเทศ นอกจากนี้ยังใช้เป็นเครื่องดื่มเพื่อ

สุขภาพสำหรับรักษาโรคความดันโลหิตสูง มะเร็ง ท้องร่วง ไข้ติดเชื้อ และปรับร่างกายให้สมดุล [8] ในบัวหลวงแดงพบสารสำคัญคือ โพรไซยานิดิน (procyanidin) กลีบบัวแดงพบว่ามีอัลคาลอยด์ (alkaloids) ไขมัน (lipids) แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น [9] นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ในการป้องกันการเหนื่อยล้า บำรุงระบบประสาท โดยงานวิจัยในสัตว์ทดลอง ซึ่งศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase, AChE) มีรายงานการศึกษาในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดและความจำบกพร่อง พบว่าสารสกัดจากดอกบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) สามารถป้องกันภาวะความจำบกพร่อง และลดระดับความเสียหายในสมอง ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในสมอง ลดระดับคอร์ติโคสเทอโรน (corticosterone) และลดการทำงานของเอนไซม์ AChE เอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase, MAO) ชนิด A และ B ได้ พบความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสเพิ่มขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่าดอกบัวหลวงสามารถป้องกันความเสียหายของสมองที่เกิดจากความเครียดโดยอาศัยการต้านอนุมูลอิสระ การสร้างเซลล์ประสาทใหม่ ร่วมกับปรับปรุงการทำงานของสารโคลิเนอร์จิค (cholinergic agent) และสารโมโนเอมิเนอร์จิค (monoaminergic agent) ในสมองได้ [10]

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าวิธีการผลิตชาที่ได้รับการยอมรับและมีการอ้างอิงมากที่สุดมี 3 วิธีการ ซึ่งทำให้ได้ชา 3 แบบ คือ ชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (non-fermented tea, NF tea) ชากึ่งหมัก (semi-fermented tea, SF tea) และชาที่หมักอย่างสมบูรณ์ (completely fermented tea, CF tea) [11] ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาผลของวิธีการผลิตชาดอกบัวหลวงแดงต่อปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ และเป็นประโยชน์ในเชิงพาณิชย์และสาธารณะในอนาคตต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. สารเคมี

สารมาตรฐานยาโดนีพีซิล (donepezi) จากบริษัท Pfizer (ARICEPT®, USA) กรดแกลลิก (gallic acid) เคอร์ซิติน (quercetin) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เอบีทีเอช (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS) ดีทีเอ็นบี (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) ไทโอโคลีนไอโอไดด์ (thiocholine iodide) ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (AChE) และสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) ดีพีพีเอช (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) จากบริษัท Chemipan Corporation Co., Ltd. (Bangkok, Thailand) และสารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้เป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์

2.2. การเตรียมผลิตภัณฑ์ชาดอกบัวหลวงแดง

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาคือ บัวหลวงแดง โดยได้รับการยืนยันพันธุ์พืชและสนับสนุนดอกบัวหลวงแดง จากผู้ช่วยศาสตราจารย์สมพิศ ตามสั่ง อาจารย์ประจำสาขาประมง ผู้เชี่ยวชาญด้านสาขาพืชน้ำ โดยใช้ส่วนกลีบบัวหลวงแดง เก็บในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ.2565 ที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร

จากการศึกษาพบว่า วิธีการผลิตชาที่ได้รับการยอมรับและมีการอ้างอิงมากที่สุดมี 3 วิธีการหลัก ซึ่งทำให้ได้ชา 3 แบบ คือ ชาที่ไม่หมัก (ชา NF) ชากึ่งหมัก (ชา SF) และชาที่หมักอย่างสมบูรณ์ (ชา CF) [11] ดังนั้นในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงแบ่งการเตรียมชาจากดอกบัวหลวงแดง ออกเป็น 3 วิธี คือ

(1) ชา NF [12] เตรียมโดยนำกลีบดอกบัวหลวงแดงไปนึ่ง ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นวดคลึงดอกบัวหลวงแดงที่นึ่งเป็นเวลา 5 นาที และอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven; Redline, German) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บชาดอกบัวหลวงแดงในภาชนะกันความชื้นที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

(2) ชา SF [13] เตรียมโดยนำกลีบดอกบัวหลวงแดงอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven; Redline, German) ที่อุณหภูมิ 45 องศา เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บชาดอกบัวหลวงแดงในภาชนะกันความชื้นที่อุณหภูมิห้อง

(3) ชา CF tea [13] เตรียมโดยนำกลีบดอกบัวหลวงแดงมานวดคลึง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดกระบวนการออกซิเดชั่น จากนั้นนำดอกบัวหลวงแดงที่ได้อบความร้อนด้วยด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven; Redline, German) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บชาดอกบัวหลวงแดงในภาชนะกันความชื้นที่อุณหภูมิห้อง

นำชาดอกบัวหลวงแดงที่ได้จากการเตรียมชาทั้ง 3 วิธี มาคำนวณหาร้อยละปริมาณของน้ำหนักแห้งของชาดอกบัวหลวงแดงต่อสมุนไพรสด (%Yield) จากสูตร (น้ำหนักของชาแห้ง/น้ำหนักของสมุนไพรสด) x 100

การเตรียมชาดอกบัวหลวงแดง ตามมาตรฐานการประเมินใบชาจีน โดยชงชานาน 3-5 นาที ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนชาต่อน้ำ 1:50 หลังจากนั้นนำมากรอง และนำชาทั้ง 3 วิธี มาศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้ง AChE ต่อไป [14]

2.3. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ของชาดอกบัวหลวงแดง ใช้วิธี Folin-Ciocalteu โดยเริ่มจากผสม 50% Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 158 ไมโครลิตร หยดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติม 20% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่มืด ในอุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite® 200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland) และคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟฟีนอลิกรวมมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของชาอบแห้ง (mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry tea) [15]

2.4. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoids content) ของชาดอกบัวหลวงแดง ใช้วิธี modified aluminum chloride colorimetric method [16] โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำสารตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย 2% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (เตรียมสาร 2 กรัมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร การคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทำโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซิตินที่ความเข้มข้น 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมของชาอบแห้ง (mg quercetin equivalent (QE)/g dry tea)

2.5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาดอกบัวหลวงแดงด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 0.05-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับรีแอคชั่นมิกเจอร์ (reaction mixture) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (สารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ที่เตรียมเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite® 200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ในช่วงความเข้มข้น 0.0125-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ให้ลดลงได้ร้อยละ 50 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50}) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) ดังสมการ

$$\%Inhibition = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

โดยที่

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง $y = ax + b$ และคำนวณค่า IC_{50} โดยแทนค่า 50 ที่ y ในสมการเส้นตรง จะได้ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่าง รายงานผลในหน่วยของมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) [17]

2.6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาดอกบัวหลวงแดงด้วยวิธี DPPH

เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นโดยใช้สารละลาย DPPH (1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร [18] การทดลองมีขั้นตอนดังนี้ นำสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.039 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารสมุนไพรตัวอย่างปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร (โดยใช้ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.05-1

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย Microplate reader (Infinite® 200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland) โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกรายงานเป็นค่า IC_{50} .ในหน่วยของมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีวิธีคำนวณเช่นเดียวกับการคำนวณค่า IC_{50} ในข้อ 2.5.

2.7. การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE) ใช้วิธีการที่อาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ระหว่างอะซิติลโคลีนกับเอนไซม์ AChE ซึ่งทำให้ได้ไทโอโคลีน (thiocholine) เมื่อสารนี้ทำปฏิกิริยากับ 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) จะได้สารสีเหลือง [19] ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้ง AChE มีขั้นตอน ดังนี้ นำตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับรีแอคชั่นมิกเจอร์ (reaction mixture) ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารละลาย DTNB ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร สารละลายไทโอโคลีนไอโอไดด์ (ATCI) ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และสารละลาย AChE ความเข้มข้น 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite® 200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland) ร้อยละการยับยั้ง (%Inhibition) คำนวณโดยการเปรียบเทียบอัตราการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ของ ATCI ของตัวอย่างกับอัตราการไฮโดรไลซิสของ 50% เมทานอลในบัฟเฟอร์ (blank) โดยใช้ยาโดนีพีซิล (donepezil) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE (ความเข้มข้น 1-32 มิลลิโมลาร์) ฤทธิ์ยับยั้ง AChE ถูกรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ยับยั้ง AChE ให้ลดลงได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยมีวิธีการคำนวณเช่นเดียวกับการคำนวณค่า IC_{50} ในข้อ 2.5.

2.8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean, SEM) (n=3) นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ร่วมกับการทดสอบแบบ Tukey's *post-hoc* test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ p-*value*<0.05 (p<0.05) ด้วยโปรแกรม statistical package for the social science (IBM SPSS) เวอร์ชั่น 29.0

3. ผลการวิจัย

3.1. ลักษณะทางกายภาพของชาดอกบัวหลวงแดง

สีของชาดอกบัวหลวงแดงที่ผลิตโดยวิธีการที่ต่างกันมีลักษณะทางกายภาพที่ต่างกัน โดยชา NF ซึ่งไม่ผ่านการหมักมีลักษณะเป็นสีเหลืองอ่อน ชา SF มีลักษณะเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล และชา CF ซึ่งผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ มีลักษณะสีเหลืองอมทอง (Figure 1)

ร้อยละปริมาณของน้ำหนักแห้งของชาดอกบัวหลวงแดงต่อสมุนไพรสด (%Yield) ของชาทั้ง 3 แบบ มีค่าที่แตกต่างกัน โดย %Yield ของชา NF, SF และ CF มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 13.00, 13.29 และ 12.05 ตามลำดับ (Table 1)

3.2. ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาดอกบัวหลวงแดง

จากการศึกษาพบว่าชา CF มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (8.77 ± 0.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของชาอบแห้ง) รองลงมาคือ ชา SF (5.68 ± 0.15 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของชาอบแห้ง) และชา NF (5.35 ± 0.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของชาอบแห้ง) ตามลำดับ โดยชา CF มีปริมาณฟีนอลิกรวมแตกต่างจากชาแบบอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2)

การศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่าชา NF มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (3.38 ± 0.12 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมของชาอบแห้ง) รองลงมาคือชา CF และชา SF (3.09 ± 0.09 และ 2.55 ± 0.16 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมของชาอบแห้ง ตามลำดับ) โดยชา NF และ ชา CF มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างจากชา SF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2)

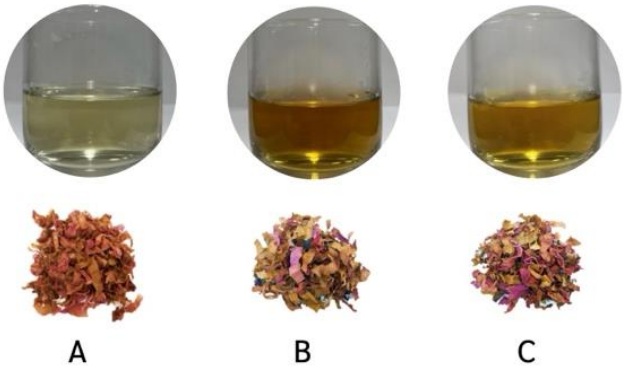

Figure 1 Physical characteristics of *N. nucifera* petal tea
(A) non-fermented tea, (B) semi-fermented tea and (C) completely fermented tea

Table 1 Physical characteristics and percent yields of *N. nucifera* petal tea

***N. nucifera* petal tea**	**Physical characteristics**	**Weight of dry tea (g)**	**%Yield**
Non-fermented tea	Yellow	13.00	13.00
Semi-fermented tea	Brownish red	13.29	13.29
Completely fermented tea	Slightly yellow and green	12.05	12.05

Table 2 Total phenolic contents and total flavonoid contents of *N. nucifera* petal tea

***N. nucifera* petal tea**	**Total phenolic contents (mg GAE/g dry tea)**	**Total flavonoid contents (mg QE/g dry tea)**
Non-fermented tea	5.35 ± 0.54^{aaa}	3.38 ± 0.12
Semi-fermented tea	5.68 ± 0.15^{aa}	2.55 ± 0.16$^{a, bb}$
Completely fermented tea	8.77 ± 0.21	3.09 ± 0.09

Data are presented as mean ± SEM (n = 3).

$^{a, aa, aaa}$*P* value < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively; compared to completely fermented tea

^{bb}*P* value < 0.01; compared to non-fermented tea

3.3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชาดอกบัวหลวงแดง

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ พบว่าชา CF มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.89 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชา NF และชา SF ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.23 ± 0.02 และ 3.04 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 3)

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ พบว่าชา CF มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.15 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชา SF และชา NF ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.55 ± 0.16 และ 0.34 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 3)

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าชา CF ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ส่วนชา NF และชา SF ถึงแม้ว่ามีค่า IC_{50} ต่ำ แต่ก็มีแนวโน้มที่จะยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี ทั้งนี้ค่า IC_{50} ที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก [20]

3.4. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของชาดอกบัวหลวงแดง

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าชา CF มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.62 ± 0.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชา NF และชา SF ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.59 ± 0.85 และ 9.85 ± 0.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 4) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ โดนีพีซิล (donepezil) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.50 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าดังกล่าวไม่ต่างจากค่าของชา CF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 4)

Table 3 Antioxidant activity of *N. nucifera* petal tea as studied by ABTS assay and DPPH assay

***N. nucifera* petal tea**	**IC_{50} (mg/mL)**	
	ABTS assay	**DPPH assay**
Non-fermented tea	2.23 ± 0.02***, a,	0.34 ± 0.03***, aaa
Semi-fermented tea	3.04 ± 0.14***, aa, bbb	0.30 ± 0.01***, aa
Completely fermented tea	1.89 ± 0.02***	0.15 ± 0.01
Ascorbic acid (standard reference)	0.12 ± 0.00	0.13 ± 0.01

Data are presented as mean ± SEM (n = 3).

****P* value < 0.001; compared to ascorbic acid

a, aa, aaa*P* value < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively; compared to completely fermented tea

bbb*P* value < 0.001; compared to non-fermented tea

Table 4 Acetylcholinesterase inhibitory activity of *N. nucifera* petal tea

***N. nucifera* petal tea**	**IC_{50} (mg/mL)**
Non-fermented tea	7.59 ± 0.85***, aa
Semi-fermented tea	9.85 ± 0.76***, aaa
Completely fermented tea	2.62 ± 0.73
Donepezil (standard reference)	0.50 ± 0.05

Data are presented as mean ± SEM (n = 3).

****P* value < 0.001; compared to donepezil

aa, aaa*P* value < 0.01 and 0.001, respectively; compared to completely fermented tea

4. อภิปรายผลการวิจัย

ภาวะความรู้คิดบกพร่องเล็กน้อย (mild cognitive impairment) ในผู้สูงอายุมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเสื่อมสลายของเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (free radical) และความเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น โรคในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดสมอง ทำให้มีการลดลงของสารสื่อประสาทกลุ่มอะซิติลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งทำให้การเรียนรู้และความจำบกพร่อง [3] ในทางการแพทย์ทางเลือก การใช้ชาจากพืชสมุนไพรจากดอกบัวหลวงแดงจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจในการป้องกันรักษาภาวะดังกล่าวข้างต้น

การศึกษานี้ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเรียนรู้และความจำ ของชาที่ได้จากการผลิตที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ ชาที่ไม่ผ่านการหมัก (ชา NF) ชากึ่งหมัก (ชา SF) และชาที่หมักอย่างสมบูรณ์ (ชา CF) ชา NF หลังการเก็บเกี่ยวจะถูกให้ความร้อนโดยการนึ่งกลีบดอก และทำให้แห้งที่อุณหภูมิสูง เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) และออกซิเดชั่น

(oxidation) ของโพลีฟีนอล (polyphenols) การนึ่งทันทีจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ในชา [21] ชา SF ใช้การผึ่งแดด (withering) ประมาณ 20-40 นาที โดยการผึ่งแดดนี้เป็นกระบวนการหมักทำให้เอนไซม์ PPO เร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน และออกซิเดชั่นของโพลีฟีนอลทำให้เกิดไดเมอร์ (dimer) และสารประกอบเชิงซ้อนของโพลีฟีนอล [22] ส่วนชา CF เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ โดยชาจากกลีบดอกบัวหลวงแดงจะถูกผึ่งให้เอนไซม์ PPO เร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน และออกซิเดชั่นของโพลีฟีนอลอย่างเต็มที่ จนได้สารประกอบกลุ่ม theaflavins และ thearubigins ซึ่งทำให้ชามีสีน้ำตาลแดง [23] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [24] ฤทธิ์ต้านมะเร็ง [25] เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ของพืชประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ [26] สารประกอบฟีนอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ที่ดีเพราะหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลทำหน้าที่ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น [27] ในการศึกษานี้พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมของชาทั้ง 3 แบบ อยู่ในช่วง 5.35 ± 0.54 ถึง 8.77 ± 0.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของชาอบแห้ง โดยชา CF มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดและแตกต่างจากชาแบบอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมของชาดำหรือชาที่ผ่านกระบวนการหมักแบบ CF แตกต่างอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับชาเขียวหรือชาที่ผ่านการผลิตแบบ NF เนื่องจากกระบวนการหมักส่งผลให้เกิดการควบแน่นและได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยเอนไซม์ PPO เช่น thearubigins และ theaflavins [28], [29] การศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาทั้ง 3 แบบ อยู่ในช่วง 2.55 ± 0.16 ถึง 3.38 ± 0.12 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมของชาอบแห้ง โดยชา NF และชา CF มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ชา SF มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมน้อยกว่าชาอีก 2 แบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นสรุปได้ว่าความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของชาทั้ง 3 แบบอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของโพลีฟีนอลที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก [30]

การตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นการตอบสนองที่พบได้ในโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) เช่น ความจำบกพร่องหรือโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) [31] การศึกษาการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ ของชาดอกบัวหลวงแดงทั้ง 3 แบบ พบว่ามีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.89 ± 0.02 ถึง 3.04 ± 0.14 และ 0.15 ± 0.01 ถึง 0.34 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Saraswathi et al. [32] ที่พบว่าสารสกัดน้ำจากดอกบัวหลวงแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี ABTS และ DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.82 และ 131.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ [32] โดยชา CF มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงนี้อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่เพิ่มขึ้นจากกระบวนการผลิตชา [20]

นอกจากนี้เซลล์ประสาทโคลินเนอร์จิค (cholinergic neuron) ใช้สารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน (acetylcholine) ในการส่งสัญญาณภายในระบบประสาท ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของสมอง เช่น การเรียนรู้และความจำ การมีสมาธิจดจ่อ ภาวะความจำบกพร่อง (cognitive impairment) ส่งผลให้ความจำ รวมไปถึงความสามารถในการตัดสินใจและการแก้ปัญหาลดลง ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับการเสื่อมของร่างกายหรือโรคอัลไซเมอร์ มีการศึกษาพบว่าการเสียสมดุลของการหลั่งสารสื่อประสาท (neurotransmitters) กลุ่มอะซิติลโคลีนจากเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิคลดลงมีความสัมพันธ์กับความจำบกพร่อง โดยพบว่าโรคอัลไซเมอร์มีจำนวนเซลล์ประสาทโคลินเนอร์จิคลดลง และมีการลดลงของระดับอะซิติลโคลีนทำให้การสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาทถูกขัดขวางจึงเกิดภาวะความจำบกพร่อง [6], [33] มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่า สารสกัดน้ำจากเมล็ด ก้าน ใบ และกลีบดอกของ *N. nucifera* สามารถยับยั้ง AChE ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสลายอะซิติลโคลีน จึงอาจชะลอหรือป้องการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ [34] การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE พบว่าชาดอกบัวหลวงแดงทั้ง 3 แบบ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 2.62 ± 0.73 ถึง 9.85 ± 0.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชา CF มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ดีที่สุด ตามด้วยชา NF และชา SF ตามลำดับ การพัฒนาวิธีการผลิตชาเพื่อคงคุณค่าทางโภชนาการและสารสำคัญของดอกบัวหลวงแดง และการศึกษาถึงปริมาณสารพฤกษเคมี ความสามารถในการ

ต้านอนุมูลอิสระ และการยั้บยั้ง AChE สามารถนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดชาดอกบัวหลวงแดงเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพและเป็นประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป

5. บทสรุป

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ชาดอกบัวหลวงแดงทั้ง 3 แบบที่ได้จากการผลิตชาที่แตกต่างกัน คือ ชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (ชา NF) ชากึ่งหมัก (ชา SF) และชาที่หมักอย่างสมบูรณ์ (ชา CF) มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE โดยชา CF มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยั้บยั้งเอนไซม์ AChE ดีที่สุด ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการพัฒนาต่อยอดชาดอกบัวหลวงแดงเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพในเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป แต่อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของชาดอกบัวหลวงแดงโดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ตลอดจนการศึกษาถึงความปลอดภัยทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สำหรับความเอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้

7. References

[1] Department of Older Persons (DOP). 2023. **General Older Persons' Information.** https://www.dop.go.th/th/know/1. Accessed 13 January 2024. (*in Thai*)

[2] Economic and Social Commission for Asia and the Pacific (ESCAP). 2022. **ESCAP Population Data Sheet 2022.** https://www.unescap.org/kp/2022/2022-escap-population-data-sheet. Accessed 13 January 2024.

[3] Eshkoor, S.A. and et al. 2015. Mild cognitive impairment and its management in older people. **Clinical Interventions in Aging.** 10: 687-693.

[4] Pharanwit, A. 2021. Dementia. **Regional Health Promotion Center 9 Journal.** 15(37): 392-398. (*in Thai*)

[5] Liguori, I. and et al. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging.** 13: 757-772.

[6] Chen, X. and Zhang, Y. 2024. A review of the neurotransmitter system associated with cognitive function of the cerebellum in Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research.** 19(2): 324-330.

[7] Aryal, S. and et al. 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. **Plants.** 8(4): 96.

[8] Saengkhae, C., Arunnopparat, W. and Sungkhajorn, P. 2007. Antioxidative activity of the leaf of *Nelumbo nucifera* Gaertn. on oxidative stress-induced erythrocyte hemolysis in hypertensive and normotensive rats. **Thai Journal of Physiological Sciences.** 20(2): 70-78.

[9] Ahmed, H. and et al. 2019. A review of the important pharmacological activities of *Nelumbo nucifera*: A prodigious rhizome. **International Journal of Biomedical and Advance Research.** 10(01): e5007.

[10] Prabsattroo, T. and et al. 2016. Positive modulation of pink *Nelumbo nucifera* flowers on memory impairment, brain damage, and biochemical profiles in restraint rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 2016: 5789857.

[11] Ravichandran, R. and Parthiban, R. 1998. The impact of processing techniques on tea volatiles. **Food Chemistry.** 62(3): 347-353.

[12] Deb, S. and Jolvis, K.R. 2016. A review of withering in the processing of black tea. **Journal of Biosystems Engineering.** 41(4): 365-372.

[13] Roshanak, S., Rahimmalek, M. and Goli, S.A. 2016. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. **Journal of Food Science and Technology.** 53(1): 721-729.

[14] Feng, Z. and et al. 2019. Tea aroma formation from six model manufacturing processes. **Food Chemistry.** 285: 347-354.

[15] Ohnon, W. and et al. 2019. The combined extract of black sticky rice and dill improves poststroke cognitive impairment in metabolic syndrome condition. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 2019: 9089035.

[16] Luximon-Ramma, A. and et al. 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 50(18): 5042-5047.

[17] Sriset, Y. and et al. 2021. *In vitro* antioxidant potential of *Mallotus repandus* (Willd.) Muell. Arg stem extract and its active constituent bergenin. **Songklanakarin Journal of Science and Technology.** 43(1): 24-30.

[18] Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature.** 181(4617): 1199-1200.

[19] Ellman, G.L. and et al. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology.** 7(2): 88-95.

[20] Zargar, B. and et al. 2018. Effect of different processing parameters on antioxidant activity of tea. **Journal of Food Measurement and Characterization.** 12: 527-534.

[21] Pasrija, D. and Anandharamakrishnan, C.J. 2015. Techniques for extraction of green tea polyphenols: A review. **Food and Bioprocess Technology.** 8: 935-950.

[22] Roshanak, S., Rahimmalek, M. and Goli, S.A. 2016. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. **Journal of Food Science and Technology.** 53(1): 721-779.

[23] Deb, S. and Jolvis, K.R. 2016. A review of withering in the processing of black tea. **Journal of Biosystems Engineering.** 41(4): 365-372.

[24] Yoshino, K. and et al. 1994. Antioxidative effects of black tea theaflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by tert-butyl hydroperoxide. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** 17(1): 146-149.

[25] Tan, Q. and et al. 2019. Structure-activity relationship analysis on antioxidant and anticancer actions of theaflavins on human colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 67(1): 159-170.

[26] Tungmunnithum, D. and et al. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines.** 5(3): 93.

[27] Bendary, E. and et al. 2013. Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. **Annals of Agricultural Sciences.** 58(2): 173-181.

[28] Gardner, E.J. and et al. 2007. Black tea - helpful or harmful? A review of the evidence. **European Journal of Clinical Nutrition.** 61(1): 3-18.

[29] Thennakoon, T. and et al. 2022. Total phenolic content, total flavonoid content and in vitro antioxidant activities measured by the FRAP, ABTS, DPPH and ORAC assays of Sri Lankan black and green tea (*Camellia sinensis*) infusions. **Food Biology.** 11: 1-10.

[30] Zargar, B. and et al. 2018. Effect of different processing parameters on antioxidant activity of tea. **Journal of Food Measurement and Characterization.** 12: 527-534.

[31] Ha, S. and Park, S. 2006. Glutamate-induced oxidative stress, but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells. **Neuroscience letters.** 393(2-3): 165-169.

[32] Saraswathi, K. and et al. 2019. Antioxidant and antidiabetic activities of fresh aqueous pink petals of Indian lotus-*Nelumbo nucifera* Gaertn. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics.** 9(5): 82-88.

[33] Chen, R. and et al. 2002. Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. **Molecules.** 27(6): 1816.

[34] Temviriyanukul, P. and et al. 2020. The effect of sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) and its mixtures on phenolic profiles, antioxidant activities, and inhibitions of the key enzymes relevant to Alzheimer's disease. **Molecules.** 25(16): 3713.