การต้านอนุมูลอิสระและการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากโบตั๋น

The Antioxidant and Antibacterial Activities of Peony (*Paeonia* sp.) Crude Extract

สุภกร บุญยืน*, ธนัทภัทร เพชรรัตน์, ละมัย พวงบุรี และอธิคุณ ศรีไพร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ปาริยา ณ นคร และนิรมล ศากยวงศ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Supakorn Boonyuen*, Lamai Pongburi and Athikun Sriphai

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Pariya Na Nakorn and Niramol Sakkayawong

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดสารจากดอก ก้านดอก ใบ และก้านใบของโบตั๋น โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือเอทิลอะซิเตทและเมทานอล การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบถูกทดสอบโดยใช้สารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-ฟีคิลไฮดราซิลไฮเดรต (ดีพีพีเอช) เป็นอนุมูลอิสระ และการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธีโฟลินซิโอแคลตู ในขณะที่การวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใช้วิธีของดาส์ว จากผลการทดลองพบว่าตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทให้สารสกัดหยาบที่แสดงปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 331.687±0.009 µg GAE/mg dry wt. และ 55.967±0.007 µg QE/mg dry wt. ตามลำดับ ดังนั้นเอทิลอะซิเตทจึงเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์จากโบตั๋นได้ดีที่สุด โดยเฉพาะในส่วนของดอกและก้านดอก และตัวอย่างสารสกัดหยาบเอทิลอะซเตทจากดอกโบตั๋นให้ค่าการต้านอนุมูอิสระดีที่สุด (IC_{50} 0.850±0.080 ppm) นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากดอกและก้านดอกโบตั๋นยังแสดงความสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้อีกด้วย

คำสำคัญ : การต้านอนุมูลอิสระ; การต้านแบคทีเรีย; สารสกัดจากโบตั๋น

***Corresponding author:** *chemistrytu@gmail.com* *DOI: 10.14456/tjst.2015.5*

Abstract

The antioxidant properties of different parts of *Paeonia* sp, including flower, flower stalk, leaf and leaf stalk, were examined from various solvent extractions. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate (DPPH) for free radical scavenging method, Folin-Ciocalteu method for total phenol compounds (TPC) and total flavonoid compounds (TFC) content by Down's method were used to analyze the extracts. Ethyl acetate crude extracts exhibited the highest phenolic and flavonoid compounds especially from petals and flower stalk parts. The total phenols and total flavonoid compounds of flower stalk ethyl acetate extract were 331.687±0.009 µg GAE/mg dry wt. and 55.967±0.007 µg QE/mg dry wt., respectively. On this basic result, ethyl acetate and methanol showed highly potential solvent to extract the active compounds from *Paeonia* sp. The results are in agreement with the antioxidant activities. The greatest antioxidant activity found in the crude flower extract of ethyl acetate solvent (IC50 0.850±0.080 ppm). Furthermore, the mentioned ethyl acetate crude extracts showed high ability to inhibit bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: antioxidant; antibacterial; Peony crude extract; *Paeonia* sp.

1. คำนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) ที่ไม่เสถียร สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ว่องไว ดังนั้นจึงสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกายได้ เช่น โปรตีน ไขมัน หรือสารพันธุกรรม ในภาวะที่อนุมูลอิสระมากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย เรียกภาวะนี้ว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน (Rong-Zhen and Dao-Wei, 2013) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (aeterosclerosis) เป็นสาเหตุร่วมในการเกิดโรคมะเร็ง (cancer) นอกจากนี้ทำให้ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่น (wrinkle) และเกิดเป็นจุดสี (lipofuscin spot) (Asha Devi and Prathima, 2003)

พืชสมุนไพรและดอกไม้เป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catechin derivative ที่ได้ และ silymarin เป็นต้น (Ting *et* al., 2007) การประยุกต์ใช้พืชและดอกไม้ในท้องถิ่นเพื่อรักษาโรค เป็นภูมิปัญญาของมนุษย์ที่สืบทอดกันมานานจนเกิดการสั่งสมเป็นวัฒนธรรม แต่อย่างไรก็ตาม พืชและดอกไม้บางชนิดยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสารที่ออกฤทธิ์หรือพิษวิทยา เป็นต้น จึงเป็นเหตุให้ผู้ใช้ไม่มั่นใจในการใช้พืชและดอกไม้นั้น รวมทั้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การพัฒนาผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรและการสกัดสารออกฤทธิ์ทางยาจากพืชไม่พัฒนาเท่าที่ควร

โบตั๋น (*Paeonia* sp.) เป็นไม้ดอกสกุล *Paeonia* วงศ์ Paeoniacea เป็นพืชพื้นเมืองของเอเชีย สามารถพบได้ในประเทศจีน ตอนใต้ของยุโรป และตะวันตกของอเมริกาเหนือ มีงานวิจัยศึกษาสรรพคุณทางยาเพื่อใช้ในการรักษาโรค พบว่ารากของดอกโบตั๋นมีสรรพคุณในการรักษาโรคระดูผิดปกติในสตรี โรคหืด และโรคชัก (Elena *et al*., 2009) นอกจากนี้สารสกัดจากดอกโบตั๋นยังมีสรรพคุณในการช่วยบำรุงดูแลให้ผิวชุ่มชื่นและเปล่งปลั่ง เมื่อนำมาผสมกับน้ำมันมะกอก สารสกัดจากมะละกอ และผลเบอร์รี่ ทำให้สารผสมที่ได้มีสรรพคุณในการแก้ปัญหารอยคล้ำรอบดวงตาและ

ผื่นแดง หรือก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน นอกจากนี้ยังมีสารสกัดอื่น ๆ อีกหลากหลายชนิด ง rutin และ anhydrous caffeine ที่มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นระบบไหลเวียนโลหิต สารสกัดจาก Pueraria root ช่วยปรับผิวใต้ดวงตาให้ขาวขึ้น และควบคุมการสร้างเมลานิน บรรเทาอาการอักเสบ รักษาความชุ่มชื่น จึงช่วยให้ผิวรอบดวงตาสดชื่น เปล่งปลั่ง หมดปัญหารอยดำคล้ำ เพิ่มความสดชื่น มีชีวิตชีวาให้รอบดวงตา ช่วยกระตุ้นระบบไหลเวียนโลหิตพร้อม ๆ กับควบคุมการสร้างเมลานิน เสริมใบหน้าให้อ่อนใสอย่างเป็นธรรมชาติ (Aiko, *et al*, 1991; Jinling *et al*., 2012; Ching and Rajeev, 2014)

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษากระบวนการสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของโบตั๋น ได้แก่ ดอก ก้านดอก ใบ และก้านใบ โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโว-นอยด์ทั้งหมด รวมทั้งศึกษาความสามารถในการต้านแบคทีเรียด้วย เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำสารสกัดหยาบจากโบตั๋นนี้ไป พัฒนางานในด้านต่าง ๆ เช่น ทางเภสัชกรรม อาหารเสริมสุขภาพ อุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป ในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งเน้นเปรียบเทียบตัวทำละลาย ชนิดที่มีขั้วเพื่อใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากดอก ก้านดอก ใบ และก้านใบของโบตั๋น โดยตัวทำละลายที่สนใจศึกษา คือ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท สารสกัดหยาบที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบหาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ดีพีพีเอ็ช หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compound, TPC) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid compound, TFC) ด้วยวิธีการเทียบกราฟมาตรฐานของสารกรดแกลลิคและคัวซิติน ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดหยาบที่ได้นำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) อันเป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาในอนาคตต่อไป

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 การสกัดสารตัวอย่าง

ตัวทำละลายที่เลือกใช้ในการสกัด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยชั่งตัวอย่างโบตั๋นทั้ง 4 ส่วน ส่วนละ 50 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมตัวทำละลาย 450 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.4 และล้างเศษตกค้างด้วยสารละลายที่ใช้ในการสกัด จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ลงในภาชนะสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.2 การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบ โดยวิธี DPPH assay

ดัดแปลงตามวิธีของ Sharma และ Tej (2009) โดยเติมสารละลายอนุมูลอิสระเสถียร DPPH 0.08 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารสกัดเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และเจือจางด้วยตัวทำละลายเมทานอล (ปรับความเข้มข้นช่วง 10-100 ppm) รวมทั้งปรับปริมาตรให้เป็น 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้ตัวทำละลาย

เมทานอลเป็น blank แทนสารสกัดตัวอย่างเพื่อคำนวณค่า A_B นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระจากดีพีพีเอช [free radical scavenging activity (%)] ดังสมการ % DPPH inhibition = $[(A_B - A_S) \times 100] \div A_S$ (1) เมื่อ A_B คือ absorbance of blank และ A_S คือ absorbance of sample แล้วนำค่าความเข้มข้นที่ได้เตรียมในข้างต้น (10-100 ppm) มาสร้างความสัมพันธ์กับผลร้อยละการยับยั้งด้วยวิธี DPPH หลังจากนั้นเลือกช่วงที่เป็นเส้นตรงโดยจะต้องเป็นเส้นตรงในช่วงร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 50

2.3 การหาปริมาณ total phenolic compound

สารสกัดหยาบโบตั๋นที่ได้ถูกนำมาศึกษาโดยใช้วิธีโฟลินซิโอแคลทูดัดแปลงตามวิธีของ Pitchaporn และคณะ (2014) โดยเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ความเข้มข้น 10 % โดยปริมาตร ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารสกัดหยาบโบตั๋นที่มีความเข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 % โดยน้ำหนัก ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาณ อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 731 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลเป็น blank นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค รายงานผลเป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิคต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (µg GAE/mg dry wt.)

2.4 ศึกษาการหาปริมาณ total flavonoid compound

โดยใช้วิธี Down's method และดัดแปลงตามวิธีของ Onanong และคณะ (2011) โดยเติมน้ำปราศจากไอออน 1.25 มิลลิลิตร ในขวดสีชา เติมสารสกัดหยาบโบตั๋นเข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 5 % โดยน้ำหนัก ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ความเข้มข้น 10 % โดยน้ำหนัก ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 275 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ช่วงคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดโบตั๋นเป็น blank นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานควัซิติน และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมของควัซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (µg QE/mg dry wt.)

2.5 ศึกษาความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* มากระตุ้นให้เจริญบนอาหาร nutrient agar นำแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมความเข้มข้นไว้ 105-107 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อ และใช้วิธีการ spread plate technique จากนั้นรอให้เชื้อแห้ง แล้วนำแผ่น sterile blank disk (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) วางในจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียข้างต้นแล้วกด เบา ๆ หยดสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบน sterile blank disk โดยหยดตรงกลางแผ่นในลักษณะตั้งตรง เพื่อให้สารกระจายได้สม่ำเสมอ โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลเป็น solvent control และใช้สารละลาย penicillin เป็น positive control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16 ชั่วโมง แล้ว อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญเติบโต (inhibition zone) (เซนติเมตร) ค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ที่ได้นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0

3. ผลการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยการสกัดสารออกฤทธิ์ทางยาจากพืชมักนิยมใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว อาทิ เช่น เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน น้ำ (Asha Devi and Prathima, 2003; Ting *et al*., 2007; Elena *et al*., 2009) ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นเปรียบเทียบสารสกัดหยาบของโบตั๋นส่วนต่าง ๆ ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง 2 ชนิด คือ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท ดังผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบโบตั๋นส่วนต่าง ๆ ในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC)

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ส่วนประกอบโบตั๋น	IC_{50} (ppm)	TPC (μg GAE/ mg dry wt.)	TFC (μg QE/ mg dry wt.)
เอทิลอะซิเตต	ดอก	0.850±0.080	179.698±0.008	54.733±0.043
	ก้านดอก	0.890±0.030	331.687±0.009	55.967±0.007
	ใบ	1.510±0.030	237.449±0.017	42.387±0.076
	ก้านใบ	0.810±0.070	188.615±0.008	39.506±0.016
เมทานอล	ดอก	2.320±0.130	459.122±0.008	20.576±0.293
	ก้านดอก	2.630±0.030	274.759±0.008	22.634±0.057
	ใบ	2.440±0.060	291.495±0.017	19.342±0.311
	ก้านใบ	2.750±0.070	172.428±0.008	8.642±0.046
สารมาตรฐาน ascorbic (vitamin C)		3.086±0.070	6.506±0.005	2.062±0.007

จากตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลจะให้ค่า IC_{50} ที่มากกว่ากรณีสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตท แสดงว่าตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าตัวทำละลายเมทานอล (Chaâbane *et al*., 2014) กรณีตัวอย่างก้านใบโบตั๋นที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจะให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่าได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในบริเวณดังกล่าวมีส่วนประกอบของคลอโรฟิลล์อยู่มากซึ่งมีรายงานว่าสามารถใช้คลอโรฟิลล์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Ursula *et al*., 2005) จึงส่งผลให้ค่าที่ได้มีค่าต่ำกว่า

ในกรณีอื่น ๆ ทั้งนี้สารสกัดหยาบที่ได้ในขั้นตอนดังกล่าวมีลักษณะเป็นยางหนืดสีเขียวเข้มจึงสอดคล้องกับการมีปริมาณคลอโรฟิลล์ ทั้งนี้สารดังกล่าวยังละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ซึ่งการแยกคลอโรฟิลล์ออกจากสารที่ออกฤทธิ์ทางยาทำได้ยากและต้องผ่านกระบวนการซับซ้อน (Christian, 1987) อย่างไรก็ตาม ชนิดตัวอย่างที่ศึกษาด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทให้ค่า IC_{50} จากต่ำไปสูง แสดงได้เป็นก้านใบ ดอก ก้านดอก และใบ ตามลำดับ

มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่พบโดยมากมักเป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ (Aiko *et al*., 1991) ในงานวิจัยนี้ได้ติดตามความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบของดอกโบตั๋นประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระต่อปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compound, TPC) ของสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดหยาบของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทของก้านดอกโบตั๋นจะมีปริมาณ TPC มากที่สุด 331.687±0.009 µg GAE/mg dry wt. และจากสารสกัดหยาบของตัวทำละลายเมทานอลจะเห็นว่าดอกโบตั๋นมีปริมาณ TPC มากที่สุด 459.122±0.008 µg GAE/mg dry wt. แสดงให้เห็นว่าชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสารกลุ่มฟีนอลในตัวอย่างโบตั๋น เมื่อศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid compound, TFC) ของสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดหยาบของตัวทำละลายชนิดเอทิลอะซิเตทจะมีปริมาณ TFC มากกว่าของชนิดตัวทำละลายเมทานอลที่ใช้ในการสกัด และจากสารสกัดหยาบของตัวทำละลายสกัดเอทิลอะซิเตท พบว่า ก้านดอกโบตั๋นจะมีปริมาณ TFC มากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 55.967 ±0.007 µg QE/mg dry wt. และจากสารสกัดหยาบของเมทานอล พบว่าก้านดอกโบตั๋นก็ให้ปริมาณ TFC มากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 22.634±0.057 µg QE/mg dry wt. ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สนใจเป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ ในกรณีส่วนประกอบของดอกโบตั๋นและก้านดอกโบตั๋นจะให้ค่า TPC และ TFC สูงและให้ค่า IC_{50} ต่ำ จึงเป็นผลสะท้อนให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์อาจเป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์

จากรายงานการวิจัยของ Tajkarimi และคณะ (2010) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีสมบัติต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจเปรียบเทียบการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ต่อสารสกัดหยาบโบตั๋นโดย ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 1

จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดหยาบโบตั๋นจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอลให้ค่าการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย (inhibition zone) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.012$) โดยค่าเฉลี่ยของค่าการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบโบตั๋นจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทให้ค่าการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* (inhibition zone) ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบโบตั๋นโดยตัวทำละลายเมทานอล ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากส่วนประกอบต่าง ๆ ของโบตั๋นพบว่าสารสกัดหยาบจากดอกโบตั๋นสามารถให้ฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบ ก้านใบ และก้านดอกโบตั๋น ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.021$) เช่นเดียวกัน สารสกัดหยาบจากดอกและก้านใบโบตั๋นให้ฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีไม่แตกต่างกัน รองมาคือสารสกัดหยาบจากก้านดอกและใบ ตามลำดับ สารสกัดหยาบของดอกโบตั๋นโดยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทให้ฤทธิ์การยับยั้ง

แบคทีเรีย *E. coli* (2.056± 0.035 cm) และ *S. aureus* (2.102± 0.159 cm) ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะ penicillin

ตารางที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบโบตั๋น

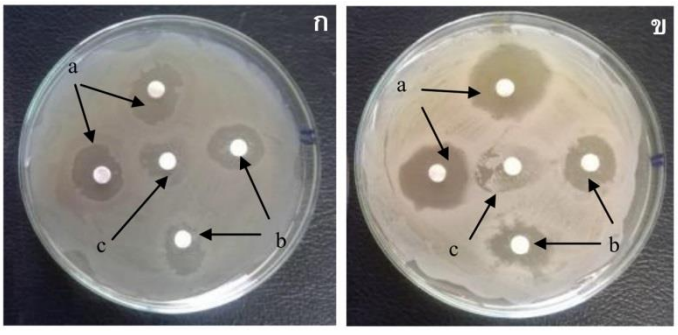
ตัวทำละลายที่ใช้สกัด*	ส่วนประกอบโบตั๋น	Inhibition zone (cm)**	
		E. coli	*S. aureus*
เอทิลอะซิเตต	ดอก	2.056±0.035^{A}	2.102±0.159^{a}
	ก้านดอก	1.816±0.283^{C}	1.995±0.088^{b}
	ใบ	1.869±0.071^{B}	1.985±0.141^{b}
	ก้านใบ	1.870±0.071^{B}	2.186±0.265^{a}
เมทานอล	ดอก	1.500±0.212^{DE}	2.075±0.035^{c}
	ก้านดอก	1.575±0.035^{D}	1.725±0.177^{d}
	ใบ	1.475±0.035^{E}	1.573±0.247^{e}
	ก้านใบ	1.550±0.000^{D}	1.475±0.035^{f}
Penicillin (positive control)		1.613± 0.053	2.563± 0.194
Methanol (solvent control)		1.531± 0.100	1.404± 0.149

*มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์แบบ Student's t-test

**มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test

$^{A-C, D-E}$ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ของสารสกัดหยาบโบตั๋นจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอลต่อแบคทีเรีย *E. coli* ตามลำดับ

$^{a-b, c-f}$ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple range test ของสารสกัดหยาบโบตั๋นจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอลต่อแบคทีเรีย *S. aureus* ตามลำดับ



รูปที่ 1 ตัวอย่างของการยับยั้งการเจริญเติบโตของ แบคทีเรีย *E. coli* (ก) และ *S. aureus* (ข) [โดย a = สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากดอกโบตั๋น, b = สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากก้านดอกโบตั๋น, c = ตัวทำละลายควบคุม (เมทานอล)]

4. สรุป

ผลจากการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียในส่วน ต่าง ๆ ของโบตั๋น ไม่ว่าจะเป็นดอก ก้านดอก ใบ และก้านใบ ด้วยตัวทำละลายที่มีความมีขั้วมาก คือเมทานอลและเอทิลอะซิเตท พบว่าตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากโบตั๋นดีที่สุด คือ เอทิลอะซิเตท ในขณะที่สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอลสกัดก้านใบโบตั๋นให้ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญน้อยที่สุด สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทจากก้านดอกโบตั๋นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 331.687±0.009 µg GAE/mg dry wt. และ 55.967±0.007 µg QE/mg dry wt. ตามลำดับ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และใช้ความเข้มข้นน้อยซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.890±0.030 ส่วนในล้านส่วน (ppm) เพื่อยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) จากการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* โดยเชื้อทั้งสองเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก ตามลำดับ ที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ในร่างกาย ทั้งโรคท้องร่วง วิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น พบว่าส่วนของดอกโบตั๋นจากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ให้ส่วนของปริมาณ inhibition zone มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 2.056±0.035 และ 2.102±0.159 เซนติเมตร ของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ตามลำดับ

จากผลการวิจัยดังกล่าวทำให้พบว่าส่วนของดอกโบตั๋นมีสารต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีโดยเฉพาะสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท แต่สารที่ได้จากส่วนอื่น ๆ ของโบตั๋นมีการยับยั้งแบคทีเรียได้เพียงเล็กน้อย จากผลการทดสอบทั้งหมดดังกล่าว ทำให้พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสกัดจากธรรมชาติสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในส่วนประกอบทางยาและการรักษาทางการแพทย์ได้ต่อไปในอนาคต และยังสามารถทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์เพื่อความปลอดภัยในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์อีกด้วย

5. เอกสารอ้างอิง

Rong-Zhen, Z. and Dao-Wei, Z., 2013, Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction, J. Integrat. Agri. 12: 1826-1838.

Asha-Devi, S. and Prathima, S., 2003, Subramanyam M.V.V., Dietary vitamin E and physical exercise II: Antioxidant status and lipofuscin-like substances in aging rat heart, Exp. Gerontol. 38: 291-297.

Ting, S., Joseph, R.P. and Juming, T., 2007, Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices, Food Chem. 105: 101-106.

Elena, P.C., Rocio, J., Julio, E.P., Manuel, A. and Javier, V., 2009, Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain, LWT-Food Sci. Technol. 42: 705-709.

Aiko, S., Tsukasa, S., Eiichi, S., Noriyuki, Y., Kazumi, Y. and Tadashi, T., 1991, Inhibitory effect of peony root extract on pentylenetetrazol-induced EEG power spectrum changes and extracellular calcium concentration changes in rat cerebral cortex, J. Ethnopharmacol. 33; 159-167.

Ching, V.H. and Rajeev, B., 2014, *In vitro* control of food-borne pathogenic bacteria by essential oils and solvent extracts of underutilized flower buds of *Paeonia suffruticosa* (Andr.), Ind. Crops Prod. 54: 203-208.

Jinling, F., Wenxue, Z., Huaibin, K., Haile, M. and Guanjun, T., 2012, Flavonoid constituents and antioxidant capacity in flowers of different Zhongyuan tree penoy cultivars, J. Funct. Foods 4: 147-157.

Sharma-Om, P. and Tej, B.K., 2009, DPPH antioxidant assay revisited, Food Chem. 113: 1202-1205.

Pitchaporn, W., Naret, M. and Sirithon, S., 2014, Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice husk, Food Chem. 157: 457-463.