



วิทยานิพนธ์

ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้าน
ออกซิเดชันและสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์พีนในบัวบก (*Centella*
asiatica (Linn.) Urban)

**EFFECTS OF EXTRACTION SOLVENTS AND PROCESSING
METHODS ON ANTIOXIDANT CAPACITY AND
TRITERPENES IN CENTELLA (*Centella Asiatica* (Linn.)
Urban)**

นางสาวนฤมล น้อยหอย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)
ปริญญา

.....
วิทยาศาสตรการอาหาร

สาขา

.....
วิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร

ภาควิชา

เรื่อง ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและ
สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

Effects of Extraction Solvents and Processing Methods on Antioxidant Capacity and
Triterpenes in Centella (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

นามผู้วิจัย นางสาวณฤมล น้อยหอย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ศศิธร เสงี่ยมศักดิ์
(อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม วรณัฐ คำแดง
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรัณณิ จิรภักย์กุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญ สัจจานันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

..... ศศิธร
(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบ
กลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

Effects of Extraction Solvents and Processing Methods on Antioxidant Capacity and Triterpenes
in Centella (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

โดย

นางสาวนฤมล น้อยหอย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)
พ.ศ. 2551

นฤมล น้อยหอย 2551: ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D.
124 หน้า

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (80% เมทานอล 80% เอทานอล น้ำ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และเฮกเซน) วิธีการสกัด (แบบแช่ 24 ชั่วโมง และวิธีการปั่นละเอียด) และการแปรรูป (บัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง บัวบกทำแห้งแบบถาด น้ำบัวบก น้ำชาบัวบกและน้ำบัวบกผง) ต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบไตรเทอร์ปีนในบัวบก สมบัติการต้านออกซิเดชันตรวจวัดโดยวิธี Total Phenols วิธีการวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และอนุมูลอิสระ 2,2'-azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) และวิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) โดยตรวจสอบปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัด 80% เมทานอล มีสมบัติการต้านออกซิเดชันและมีสารประกอบไตรเทอร์ปีน 4 ชนิดสูงสุด (มาเดคาสโซไซด์ กรดมาเดคาสสิก เอเชียดิโคไซด์ และกรดเอเชียดิก) สารสกัดจากวิธีสกัดแบบการปั่นให้ละเอียดแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันและมีปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าสารสกัดจากวิธีแช่ 24 ชั่วโมง การกระจายตัวของสารไตรเทอร์ปีนมาเดคาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียดิกในสารสกัด 80% เมทานอลด้วยวิธีสกัดแบบไฮโมจิเนส คือ 41.3%, 34.4%, 20.1% และ 4.2% ตามลำดับ เมื่อนำบัวบกผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีต่างๆ พบว่าความร้อนมีผลต่อปริมาณไตรเทอร์ปีน และสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยตัวอย่างบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งมีสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณไตรเทอร์ปีน (มาเดคาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ และกรดมาเดคาสสิก) สูงกว่าบัวบกทำแห้งแบบถาด สำหรับบัวบกทำแห้งแบบถาดมีสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าน้ำชาบัวบก ส่วนน้ำบัวบกมีสมบัติการต้านออกซิเดชันต่ำกว่า แต่พบปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าน้ำบัวบกผง ในตัวอย่างบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง บัวบกทำแห้งแบบถาด และน้ำชาบัวบกพบปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด (มาเดคาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียดิก) แต่ในตัวอย่างน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผงพบเฉพาะกรดเอเชียดิก และกรดมาเดคาสสิก จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างสารไตรเทอร์ปีน (เอเชียดิโคไซด์ มาเดคาสโซไซด์ และกรดมาเดคาสสิก) และสมบัติการต้านออกซิเดชันทั้ง 4 วิธี มีค่าอยู่ในช่วง $r=0.7-0.9$

นฤมล น้อยหอย
ลายมือชื่อนิติติ

ศศิธร ตรงจิตภักดี
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

51 51 51

Narumol Noiwoil 2008: Effects of Extraction Solvents and Processing Methods on Antioxidant Capacity and Triterpenes in Centella (*Centella asiatica* (Linn.) Urban). Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Mrs. Sasitorn Tongchitpakdee, Ph.D. 124 pages.

Effects of extraction solvents (80% methanol, 80% ethanol, water, petroleum ether and hexane) extraction methods (shaking and homogenizing) and processing methods (freeze drying, tray drying, spray drying, tea making and juice processing) on antioxidant capacity and triterpenes in *centella asiatica* (linn.) urban were investigated. Antioxidant capacity of samples was evaluated using total phenols, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging capacity and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assays. Triterpenes were quantified using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). Results showed that 80% methanol extract had the highest antioxidant capacity and the highest amount of triterpenes, including madecassoside, madecassic acid, asiaticoside and asiatic acid. Extraction of homogenizing method gave higher antioxidant capacity and higher amount of triterpenes than using shaking method. Distribution of madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid in 80% methanol extract using homogenizing method were 41.3%, 34.4%, 20.1% and 4.2%, respectively. Processing method had effect on antioxidant capacity and triterpenes. Freeze dried sample had higher antioxidant capacity and higher amount of madecassoside, asiaticoside and madecassic acid than tray dried sample. Tray dried sample had higher antioxidant capacity and higher amount of triterpenes than tea sample. Juice sample had lower antioxidant capacity but higher amount of triterpenes than spray dried sample. Madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid were found in freeze dried, tray dried and tea samples, while only madecassic acid and asiatic acid were found in juice and spray dried samples. There were a good correlations between triterpenes (asiaticoside, madecassoside and madecassic acid) and antioxidant capacity measured using four different methods ($r=0.7-0.9$).

Narumol Noiwoil

Student's signature

Sasitorn Tongchitpakdee 5 June 2008

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ดร.ศศิธร ตรงจิตภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราณี จิรภาคย์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่อบรม สั่งสอนมาจนถึงบัดนี้ ขอขอบพระคุณโครงการโครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร เจ้าหน้าที่ห้องสมุดคณะอุตสาหกรรมเกษตร และเจ้าหน้าที่หอสมุดกลาง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาต่างๆ เกี่ยวกับเครื่องมือ และข้อมูลที่ใช้ในการทำวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตปริญญาโทและเอก สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจเสมอมา

สุดท้าย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ ตลอดจนสมาชิกในครอบครัวทุกคน ผู้ซึ่งให้การสนับสนุนในการเรียน รวมถึงความรักและกำลังใจที่อบอุ่นในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

นฤมล น้อยหอย

มีนาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	48
สรุปและข้อเสนอแนะ	87
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	89
ภาคผนวก	101
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	124

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณค่าทางโภชนาการของบัวบก	6
2	สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบกจากหลายประเทศ	9
3	ลักษณะโครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่สำคัญในบัวบก	12
4	ค่า R_f (Retention factor) ของสารไตรเทอร์ปีนมาตรฐานและไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก	54
5	ความยาวคลื่นที่สารไตรเทอร์ปีนดูดกลืนแสงสูงสุด	56
6	ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสกัด	62
7	สมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด	66
8	ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด	70
9	สมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบัวบกทำแห้งแบบตาก	73
10	ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบัวบกทำแห้งแบบตาก	74
11	สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำชาบัวบกและบัวบกทำแห้งแบบตาก	76
12	ปริมาณไตรเทอร์ปีนของบัวบกอบแห้งแบบตากและน้ำชาบัวบก	77
13	สมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผง	78
14	ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผง	79
15	ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของแต่ละผลิตภัณฑ์	83
16	ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ปริมาณไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดและสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบก	85
17	ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างสมบัติการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัดบัวบกที่ตรวจสอบด้วยวิธีต่างๆ	86

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปภาพบัวบก (<i>Centella asiatica</i>)	4
2	สารกลุ่มควอเซติน-3-กลูโคไซด์ และสารกลุ่มแคมเฟอร์รอล-3-กลูโคไซด์	7
3	โครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่สำคัญ (เอเชียดิโคไซด์ กรดเอเชียดิกลมาเดคาสโซไซด์ และกรดมาเดคาสสิก)	11
4	โครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีน	12
5	การเกิด DNA damage และ DNA repair	25
6	รูปแบบ 3 ขั้นตอนของการเกิดเซลล์มะเร็งและความสัมพันธ์ของระดับขั้นในการเกิดเซลล์มะเร็งกับระดับปริมาณของอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่างๆของการเกิดเซลล์มะเร็ง (ในกรอบภาพ A)	26
7	กราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของตัวอย่างและสารมาตรฐาน	32
8	โครงสร้างทางเคมีของ DPPH	33
9	โครงสร้างทางเคมีของ ABTS	34
10	TLC fingerprints โดยแถวที่ 1-3: สารมาตรฐานผสม (เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียดิกล) ความเข้มข้น 1000 ppm (20 μ l) แถวที่ 4-5: สารสกัด 80% เมทานอล (20 μ l) แถวที่ 6-7: สารสกัด 80% เอทานอล (20 μ l)	49
11	TLC fingerprints โดยแถวที่ 1-3: สารมาตรฐานผสม (เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียดิกล) ความเข้มข้น 1000 ppm (20 μ l) แถวที่ 4-5: สารสกัด น้ำ (20 μ l) แถวที่ 6-7: สารสกัด ปิโตรเลียมอีเทอร์ (20 μ l) แถวที่ 8-9: สารสกัด เฮกเซน (20 μ l)	49
12	HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดคาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียดิกล) ความเข้มข้น 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-9: สารสกัด 80% เมทานอล ซ้ำ 1-3 (3 μ l)	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดลาสโซไซด์ เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียติก) ความเข้มข้น 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-9: สารสกัด 80% เอทานอล ซ้ำ 1-3 (3 μ l)	50
14	HTLC fingerprints โดยแถวที่ 1-2: สารมาตรฐานผสม (เอเชียติโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียติก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (9 และ 12 μ l) แถวที่ 3-4: สารสกัดปีโตรเลียมอีเทอร์ (20 μ l) แถวที่ 5: สารสกัด เฮกเซน (20 μ l)	51
15	HTLC fingerprints ของตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ระบบ ภาพ (ก) คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v) ภาพ (ข) คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9:1 v/v) โดยแถว ที่ 1-5: สารมาตรฐานผสม (มาเดลาสโซไซด์ (a) เอเชียติโคไซด์ (b) กรดมาเดลาสติก (c) และ กรดเอเชียติก (d)) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9, 12 และ 15 μ l) แถวที่ 6-7: สารสกัด 80% เมทานอล (1 μ l)	52
16	HTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (เอเชียติโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียติก) โดยแถวที่ 1-2: สาร มาตรฐาน ภาพ (ก) มาเดลาสโซไซด์ ภาพ (ข) เอเชียติโคไซด์ ภาพ (ค) กรดมาเด ลาสติก ภาพ (ง) กรดเอเชียติก แถวที่ 3-5: สารสกัด 80% เมทานอล (1,2 และ 3 μ l)	55
17	การดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด MA (กรดมาเดลาสติก) AA (กรดเอเชียติก) MS (มาเดลาสโซไซด์) AS (เอเชียติโคไซด์)	56
18	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 ppm ที่ความยาว คลื่น 600 nm, peak 1: มาเดลาสโซไซด์, peak 2: เอเชียติโคไซด์, peak3: กรด มาเดลาสติก, peak 4: กรดเอเชียติก	57
19	ตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอนของสารสกัดบวบทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี Total phenols	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดบัวบกทั้ง 5 ชนิด	59
21	ตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบกทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี ORAC	60
22	ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้งหมดของสารสกัดบัวบกทั้ง 5 ชนิด	64
23	HPLC fingerprints โดยลำดับที่ 1: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิก) แถวที่ 2-4: น้ำชาบัวบก แถวที่ 5-6: น้ำชาบัวบกต้มพาสเจอร์ไรส์ และแถวที่ 7-8: น้ำชาบัวบกปั่นผสมกับบัวบกสด	81
ภาพผนวกที่		
ก1	HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-3: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-9: สารสกัดจากบัวบกอบแห้ง (35 μ l)	106
ก2	HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-10: สารสกัดจากบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง (25 μ l)	106
ก3	HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-10: เครื่องดื่มบัวบกผ่านการพาสเจอร์ไรส์ (35 μ l)	107
ก4	HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9 และ μ l) แถวที่ 5-10: เครื่องดื่มชาบัวบก (3 และ 35 μ l)	107
ก5	HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm แถวที่ 5-7: บัวบกทำแห้งแบบฟ้นฝอย (40 μ l)	108

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก6 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารสกัด 80% เมทานอลที่ความยาวคลื่น 600 nm, peak 1: มาเดลาสโซไซด์, peak 2: เอเชียติโคไซด์, peak3: กรดมาเดลาสสิก, peak 4: กรดเอเชียติก	108
ก7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm ที่ความยาวคลื่น 600 nm, peak 1: มาเดลาสโซไซด์, peak 2: เอเชียติโคไซด์, peak3: กรดมาเดลาสสิก, peak 4: กรดเอเชียติก	109
ก8 กราฟมาตรฐานของมาเดลาสโซไซด์	109
ก9 กราฟมาตรฐานของเอเชียติโคไซด์	110
ก10 กราฟมาตรฐานของกรดเอเชียติก	110
ก11 กราฟมาตรฐานของกรดมาเดลาสสิก	111
ข1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับการตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอนโดยวิธี Total phenols	114
ข2 กราฟมาตรฐานของวิตามินซีสำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	115
ข3 กราฟมาตรฐานของวิตามินซีสำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	118
ข4 กราฟมาตรฐานของ Trolox สำหรับสารสกัดส่วนที่ชอบน้ำในการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC	122
ข5 กราฟมาตรฐานของ Trolox สำหรับสารสกัดส่วนที่ชอบไขมันในการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC	123

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

HPTLC =	High Performance Thin Layer Chromatography
ROS =	Reactive Oxygen Species
RNS =	Reactive Nitrogen Species
$O_2^{\bullet -}$ =	Superoxide radical
H_2O_2 =	Hydrogen peroxide
$HO^{\bullet}$ =	Hydroxyl radical
$ROO^{\bullet}$ =	Peroxyl radical
1O_2 =	Singlet oxygen
ONOO- =	Peroxyl nitrite radical
ORAC =	Oxygen Radical Absorbance Capacity assay
DPPH =	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay
TRAP =	Total Radical trapping Antioxidant Parameter assay
TEAC =	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay
ABTS =	2,2-azonobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) assay
FRAP =	Ferric ion Reducing Antioxidant Power assay
AAPH =	2',2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
RMCD =	Randomly Methylated Betacyclodextrin
B-PE =	B-phycoerythrin
L-ORAC=	ORAC value of lipophilic phase
H-ORAC=	ORAC value of hydrophilic phase
TAC =	Total Antioxidant Capacity
AA =	Asiatic acid
MA =	Madecassic acid
AS =	Asiaticoside
MS =	Madecassoside

ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและ สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

Effects of Extraction Solvents and Processing Methods on Antioxidant Capacity and Triterpenes in Centella (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

คำนำ

อนุมูลอิสระ เป็นโมเลกุลเดี่ยวที่ไม่สามารถอยู่โดดเดี่ยวได้ (highly unstable) ต้องจับคู่กับโมเลกุลอื่นเรียกว่า การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเกิดขึ้นตลอดเวลาในเซลล์ของร่างกาย ส่วนที่เหลือของอนุมูลอิสระหลังจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วจะไปทำลายเซลล์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ต่างไปจากเดิม (mutation) จนอาจจะกลายเป็นเนื้อร้าย (มะเร็ง) ซึ่งในร่างกายของคนเรามีกลไกที่ทำลายพวกอนุมูลอิสระที่เหลือจากปฏิกิริยาเหล่านี้ได้โดยการสร้างเอนไซม์ (enzyme) ขึ้นมา หรือได้จากสารอาหารบางอย่าง ที่เรารับประทาน เช่น วิตามินซี เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) มาจับกับอนุมูลอิสระ หรือทำให้เป็นกลาง (neutralize) (คำเกิง, 2541) มีการศึกษาพบว่าในผัก ผลไม้ สมุนไพร เครื่องเทศ เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระเช่น สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีน สารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ วิตามินซี เป็นต้น (Diplock *et al.*, 1998)

บัวบกเป็นพืชในวงศ์ Umbelliferae มีชื่อเรียกทางพฤกษศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban (วันดี, 2541) โดยมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในบัวบกที่แสดงสมบัติต้านออกซิเดชัน คือ สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีน ได้แก่ กรดเอเชียติก เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดลาสสิกและมาเดลาสโซไซด์ เป็นต้น โดยปัจจุบันส่วนใหญ่มักจะมีการนำบัวบกมารับประทานสดและนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น น้ำบัวบก ชาบัวบก และบัวบกแคปซูล ซึ่งมีรายงานวิจัยพบว่าปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันในบัวบก ได้แก่ ตัวทำละลาย ความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ (Hamid *et al.*, 2002)

แต่เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับผลกระทบของปัจจัยต่างๆดังกล่าวต่อสารไตรเทอร์ปีน (กรดเอเชียติก เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดลาสสิกและมาเดลาสโซไซด์) ในบัวบกยังมีข้อจำกัด ดังนั้น

งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่างชนิดกันและการแปรรูปบัวบกเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (กรดเอเชียติก เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดกาสติกและมาเดกาสโซไซด์) โดยวัดสมบัติการต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี Total phenols, Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azonobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) free radical scavenging ability (ABTS) และศึกษาปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด ด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสม (80%เอทานอล 80% เมทานอล น้ำ และ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และเฮกเซน) ในการสกัดสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (เอเชียดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดเอเชียดิ และกรดมาเดลาสสิก)ในบับก และตรวจสอบสมบัติการด้านออกซิเดชัน
2. เพื่อศึกษาผลของวิธีสกัดแบบแช่ 24 ชั่วโมงและแบบการปั่นละเอียดที่มีต่อสมบัติการด้านออกซิเดชันและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (เอเชียดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดเอเชียดิ และกรดมาเดลาสสิก)ในบับก
3. เพื่อศึกษาผลกระทบของการแปรรูปบับก (น้ำบับก บับกทำแห้งแบบถาด น้ำบับกผง บับกทำแห้งแบบเยือกแข็ง และน้ำชาบับก) ที่มีต่อสมบัติการด้านออกซิเดชันและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (เอเชียดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดเอเชียดิ และกรดมาเดลาสสิก)ในบับก

การตรวจเอกสาร

บัวบกเป็นพืชในวงศ์ Umbelliferae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban มีชื่อสามัญว่า Asiatic pennywort และมีชื่ออื่นอีก ได้แก่ จำปาเครือ กะบังหอก (ลำปาง) มันทู กะบรรณิ (สันสกฤต) เตยกำเช่า สมลัก (จีน) ผักหนอก (เหนือ) ปะหนะ ผักแว่น (ใต้) เอชาเดาะ (แม่ฮ่องสอน)

บัวบกเป็นวัชพืชในเขตร้อน พบตามที่ชื้นแฉะทั่วไป ถิ่นกำเนิดเดิมพบในอินโดนีเซีย อินเดีย ศรีลังกา ในประเทศไทยพบได้ทุกภาค (วันดี, 2541)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

บัวบกเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน เรียกว่าไหล (stolon) มีรากและใบงอกตามข้อของลำต้น ใบเดี่ยวรูปกลม ขอบใบหยัก ก้านใบยาวชูขึ้น (ภาพที่ 1) ลักษณะดอกออกเป็นช่อคล้ายร่มที่ซอกใบ แต่ละช่อมีประมาณ 3-4 ดอก กลีบดอกสีม่วงอมแดง เกสรตัวผู้สั้น ผลแบน (Hengsawas, 2004)



ภาพที่ 1 รูปภาพบัวบก (*Centella asiatica*)

ที่มา: Hengsawas (2004)

ประเภทและชนิดของบัวบก

บัวบกหรือใบบัวบกแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. บัวบก (*Centella asiatica*) มีชื่อสามัญว่า Asiatic pennywort ผักแว่น ผักหนอก ซึ่งบัวบกชนิดนี้ใช้ทำน้ำใบบัวบก
2. บัวบก (*Stephania erecta*) มีชื่อสามัญว่า บัวกืด บัวเดือ (วันดี, 2541)

การปลูกและขยายพันธุ์

บัวบกเป็นพืชที่ขึ้นง่าย ปลูกได้ทั่วไป โตได้ดีในดินที่มีความชุ่มชื้นสูงมาก สามารถปลูกได้ตลอดปี ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดและไหล แต่นิยมการปักชำไหล โดยตัดแยกไหลที่มีต้นอ่อนและมีรากงอก นำไปปลูกในที่ชื้นแฉะ ซึ่งจะขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว สามารถปลูกได้ในกระถางและภาชนะอื่นๆ หลังจากปลูก 60-90 วัน สามารถทำการเก็บเกี่ยวได้โดยใช้เล็มยอดเขาบริเวณใต้ราก แล้วดึงเอาต้นบัวบกออกมาล้างน้ำ ทำความสะอาดเก็บใบเหลือทิ้งออก

บัวบกมีรสมัน กรอบ ใช้เป็นผักทานแกล้มกับอาหาร เช่น น้ำพริก ลาบ กะปั่ว หมี่กรอบ ผัดไทยและแกงเผ็ดของทางใต้ บัวบกมีวิตามินเอและแคลเซียมมาก ช่วยบำรุงสายตาได้ดี และยังมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เส้นใย ฟอสฟอรัส เหล็ก และวิตามินหลายอย่าง (ตารางที่ 1) น้ำคั้นจากใบสด นำมาทำให้เจือจางใส่น้ำตาลและน้ำแข็ง รับประทานเป็นเครื่องดื่ม แก่กระหายน้ำ บำรุงกำลัง และแก้ช้ำใน และแก้ฟกช้ำได้ดี (วันดี, 2541)

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของบัวบก

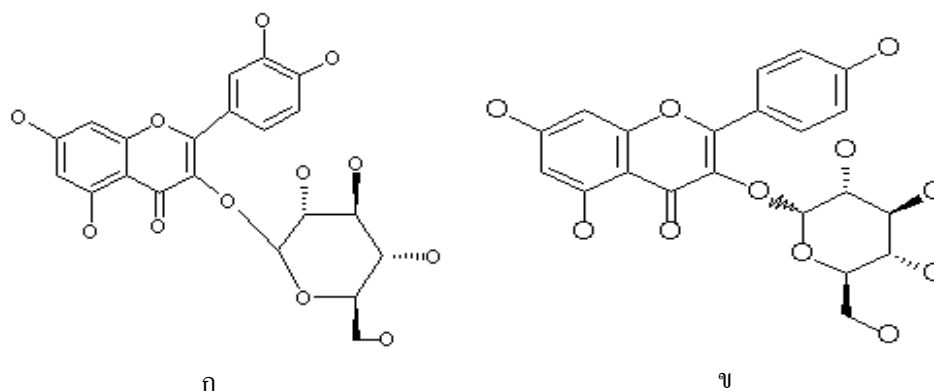
สารอาหาร	ปริมาณที่พบในบัวบก 100 กรัม
พลังงาน(กิโลแคลอรี)	44.0
โปรตีน(กรัม)	1.8
ไขมัน(กรัม)	0.9
คาร์โบไฮเดรต(กรัม)	7.1
ใยอาหาร(กรัม)	26.0
แคลเซียม(กรัม)	146.0
เบต้าแคโรทีน(RE)	238.23
ฟอสฟอรัส(มิลลิกรัม)	30.0
เหล็ก(มิลลิกรัม)	3.9
วิตามินบี1(มิลลิกรัม)	0.24
วิตามินบี2(มิลลิกรัม)	0.02
ไนอะซิน(มิลลิกรัม)	0.8
วิตามินซี(มิลลิกรัม)	4.0
วิตามินเอ(IU)	11800

ที่มา: พรณี และ จีระวรรณ (2542)

องค์ประกอบทางเคมี

ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycosides)

Prun *et al.* (1983) พบสารประกอบ ควอเซติน-3-กลูโคไซด์ (Quercetin-3-glucoside) และ แคมเฟอร์รอล-3-กลูโคไซด์ (Kaempferol-3-glucoside) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบฟลาโวน (Flavone) ในส่วนของใบของบัวบก (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 สารกลุ่มควอเซติน-3-กลูโคไซด์ (ก) และสารกลุ่มแคมเฟอรอล-3-กลูโคไซด์ (ข)

ที่มา: Prum *et al.* (1983)

กรดอะมิโนอิสระ (Free amino acids)

George and Gnanarethinan (1975) พบกรดอะมิโนอิสระในบัวบกที่ระบุได้มีทั้งหมด 25 ชนิด โดยในส่วนของใบ ก้าน และดอกของบัวบกจะพบปริมาณกรดอะมิโน เซอรีน และอะลานีน มากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น และส่วนรากของบัวบกจะพบกรดอะมิโน แอสพาเตต เซอรีน กลูตามัต ไทโอนีน อะลานีน ไลซีน ฮิสทีดีน และอะมิโนบิวไทเรต

สารประกอบโพลีอะซีติลเลนิค (Polyacetylenic compounds)

Bhattacharyya (1956 a); Bhattacharyya (1956 b); Rastogi *et al.* (1960); Tang and Eisenbrand (1992) พบสารประกอบโพลีอะซีติลเลนิค ได้แก่ pentadeca-2,9-diene-4,6-diyne-1-ol acetate, 3,8-diacetoxypentadeca-1,9-diene 4,6-diyne (Sing and Rastogi, 1969), 3-hydroxy-8-acetoxy-pentadeca-1,9-diene-4,6-diyne, 3-hydroxy-10-acetoxy-pentadeca-1,8-diene-4,6-diyne และ pentadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol

สารประกอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids compound)

สารประกอบเทอร์พีนอยด์เป็นสารสำคัญและเป็นสารที่น่าสนใจที่พบในบัวบก มีสารประกอบเทอร์พีนอยด์หลายชนิดที่ถูกแยกได้จากบัวบกได้แก่

1.1 สารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์ปีน (Mono-and sesquiterpene compounds)

Asakawa *et al.* (1982) พบสาร โมโนและเซสควิเทอร์ปีน ที่สามารถแยกได้จากบัวบก ได้แก่ β -caryophyllene, trans- β -farnesene และ germacrene-D ซึ่งเป็นสารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์ปีนหลัก นอกจากนี้ยังพบ α -copaene, β -elemene และ bicycloelemene

1.2 สารประกอบไตรเทอร์ปีน

สารประกอบไตรเทอร์ปีนเป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในบัวบก มีงานวิจัยจากหลายประเทศ (Sing and Rastogi, 1969; Bhattacharyya, 1956a, 1956b; Rastogi *et al.*, 1960; Rao and Seshadri, 1969) ที่ศึกษาสารไตรเทอร์ปีนในบัวบกโดยพบสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์และสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคเนดังแสดงตามตารางที่ 2 ซึ่งสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์และสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคเนที่ทำการศึกษานในงานวิจัยนี้คือ เอเชียดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดเอเชียดิก และกรดมาเดลาสสิก (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบกจากประเทศต่างๆ

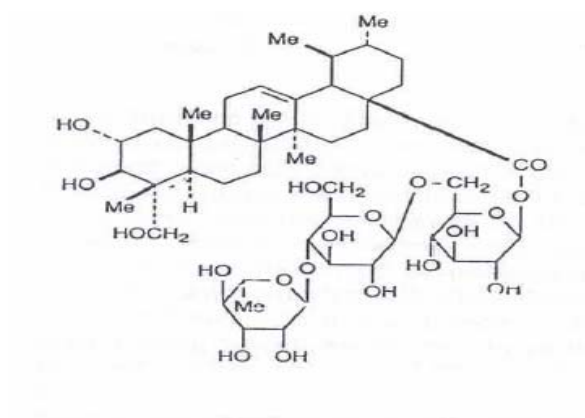
แหล่งที่ ศึกษา	สารประกอบไตร เทอร์ปีน	ส่วนที่นำมา ศึกษา	% yield	อ้างอิง
จีน	Asiaticoside	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ	Polonsky <i>et al.</i> , 1981
	Madecassoside	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ	"
ศรีลังกา	Centelloside	ทุกส่วน	0.1-0.2%	Bhattacharyya, 1956a
	Centic acid	ทุกส่วน	0.03-0.05%	"
	Centioic acid	ทุกส่วน	0.04-0.05%	"
ศรีลังกา	Centellic acid	ทุกส่วน	0.02-0.03%	"
อินเดีย	Asiaticoside A	ใบ	0.0536%	Sahu <i>et al.</i> , 1989
	Asiaticoside B	ใบ	0.0343%	Dutta and Basu, 1962
	Terminolic acid	ใบ	ไม่ได้ระบุ	"
	Thankunside	ใบ	ไม่ได้ระบุ	"
	Thankunic acid	ใบ	ไม่ได้ระบุ	"
	Asiaticoside	ทุกส่วน	0.0125%, 0.15%, 0.114%, 0.105%	Sing and Rastogi, 1969, Mahato <i>et al.</i> , 1987,
	Asiatic acid	ทุกส่วน	0.0916%	Castellani <i>et al.</i> , 1981
	Brahmic acid	ทุกส่วน	0.097%, 0.0164%	Sing and Rastogi, 1969
	Brahmoside	ทุกส่วน	0.02%, 0.37%	Sing and Rastogi, 1969, Rastogi <i>et al.</i> , 1960
	Brahminoside	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ	Rastogi <i>et al.</i> , 1960
	Isobrahmic acid	ทุกส่วน	0.4%	"
	Indocentelloside	ทุกส่วน	0.67%	Bhattacharyya, 1956b
	Indocentoic acid	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ	"
	Isothankunic acid	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ	Dutta and Basu, 1962
	Isothankunside	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ	"

ตารางที่ 2 (ต่อ) สารประกอบไตรเทอร์ปีนที่พบในบัวบกจากหลายแหล่ง

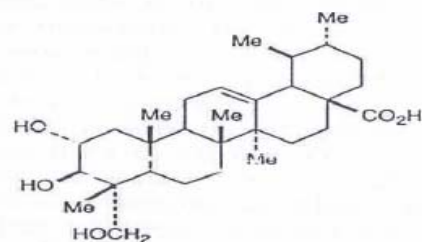
แหล่งที่ศึกษา	สารประกอบไตรเทอร์ปีน	ส่วนที่นำมาศึกษา	% yield	อ้างอิง
เกาะ มาดากัสการ์	Asiaticoside	ทุกส่วน	0.0921%-0.6%	Bontem, 1941, Boiteau and Ratsimamanga, 1956
	Asiatic acid	ทุกส่วน	0.0702%	Pasich <i>et al.</i> , 1968, Castellani <i>et al.</i> , 1981
	Madecassic acid	ทุกส่วน	0.0789%	"
	Madecassoside	ทุกส่วน	0.0051%	"
	Madasiatic acid	ทุกส่วน	ไม่ได้ระบุ	Pinhas, 1965
ไทย	Asiaticoside	ใบ, ก้าน และ ราก	1.07%, 0.16%,0.15%	Mahahpunt and Chaicharoentharwekit, 1987

ที่มา: Pramongrit (1995)

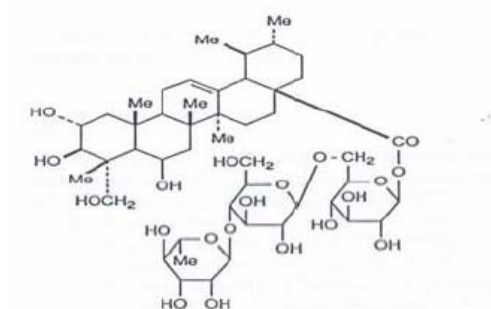
สารประกอบไตรเทอร์ปีน



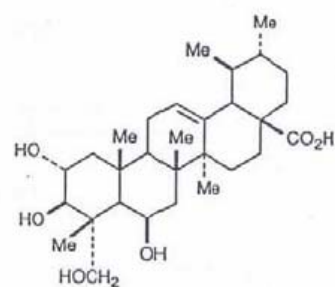
Asiaticoside



Asiatic acid



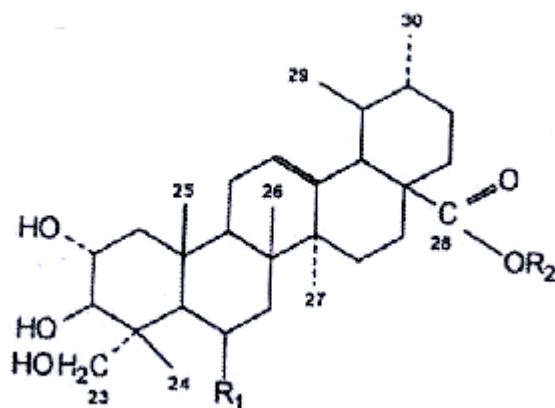
Madecassoside



Madecassic acid (Brahmic acid)

ภาพที่ 3 โครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่สำคัญ (เอเชียดิโคไซด์ กรดเอเชียดิก
มาเดคาสโซไซด์ และกรดมาเดคาสสิก)

ที่มา: Asean countries (1993)



ภาพที่ 4 โครงสร้างหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีน

ที่มา: Pramongkit (1995)

ตารางที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่สำคัญในบัวบก

สารประกอบ	R1	R2	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล
กรดเอเชียติก	H	OH	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488
กรดมาเดลาสสิก	OH	H	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	504
6β-ไฮดรอกซี กรดเอเชียติก	OH	H	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	504
กรดเทอร์มิโนลิก	OH	H	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	504
เอเชียติโคไซด์	H	Glu-glu-rham	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	958
มาเดลาสโซไซด์	OH	Glu-glu-rham	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	974
เอเชียติโคไซด์ เอ	OH	Glu-glu-rham	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	974
เอเชียติโคไซด์ บี	OH	Glu-glu-rham	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	974

หมายเหตุ Glu=glucose และ rham=rhamnose

ที่มา: Pramongkit (1995)

สารประกอบไตรเทอร์ปีนประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวง 4-5 วง มีอะตอมคาร์บอน 30 อะตอม และมีสารหมู่แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ หรือกรดคาร์บอกซิลิกเชื่อมต่อ

ก๊อบว (ภาพที่ 4) ลักษณะโดยทั่วไปของสารประกอบไตรเทอร์ปีน คือ ไม่มีสี เป็นผลึก จุดหลอมเหลวสูง เมื่อนำไปทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Burchard (acetic anhydride-conc.H₂SO₄) สารประกอบไตรเทอร์ปีน และสเตียรอยด์ (sterols) ให้สีเขียว-น้ำเงิน (Harborne, 1983)

สารประกอบไตรเทอร์ปีนพบได้ในพืชทุกชนิด แต่ส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ในพืชตระกูลชั้นสูง โดยเชื่อมต่อกับหน่วยอะซิเตทแบบหัวต่อหาง โดยสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนมีคุณสมบัติเป็นกรด มีรสชาติเผ็ดร้อนและขม ยกตัวอย่างเช่น ลิโมนินในผลไม้ตระกูลส้ม จะให้รสขม และละลายในไขมัน แต่ถ้าเป็นสารไตรเทอร์ปีนที่มี 5 วง (pentacyclic triterpenes) จะให้รสชาติที่ขมกว่า เช่น limonoids และ quassinoids ส่วนหน้าที่ของสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนที่มีต่อพืชยังไม่ทราบแน่ชัด (Harborne, 1998)

สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนจะอยู่ในรูปของไกลโคไซด์หรืออะไกลโคน โดยไกลโคไซด์มีโมเลกุลของน้ำตาลมาต่อกับโครงสร้างของไตรเทอร์ปีน ส่วนอะไกลโคนจะไม่มีโมเลกุลน้ำตาล (ตารางที่ 3) เมื่อไตรเทอร์ปีนในรูปของไกลโคไซด์ผ่านกระบวนการย่อย โมเลกุลของน้ำตาลจะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์และจะถูกดูดซึมเข้าลำไส้หรือเส้นเลือดต่อไป

จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับสารสำคัญในบัวบกที่ออกฤทธิ์ต่าง ๆ พบว่า บัวบกจะให้สารไกลโคไซด์ หลายชนิดที่ให้ผลด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation) ซึ่งส่งผลในการลดความเสี่ยงของเซลล์อวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารไกลโคไซด์ที่ได้จากบัวบกยังส่งผลในการช่วยเร่งการสร้างสารคอลลาเจน (collagen) ที่เป็นโครงสร้างของผิวจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นให้แผลสมานตัวได้เร็วขึ้น

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนในบัวบก

ปัจจุบันมีการศึกษาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณไตรเทอร์ปีนในบัวบกด้วยหลากหลายเทคนิค ได้แก่ HPLC (High Performance Liquid Chromatography), TLC (Thin Layer Chromatography) และ Colorimetric Method เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาการแยกสารไตรเทอร์ปีนและวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) จากการดัดแปลงการแยกด้วยเทคนิค TLC (Sribusarakum, 1997)

วรางคณา และคณะ (2547) พัฒนาครีมีที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกและสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ โดยสกัดบัวบกด้วยตัวทำละลายเอทานอลแบบย้อนกลับ (reflux) แล้วสกัดซ้ำด้วยเบนซีน หลังจากนั้นนำสารสกัดเอทานอลก่อนและหลังผสมในครีมีตรวจสอบชนิดและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค TLC และ HPLC โดยสภาวะที่ใช้ในการแยกสารสกัดเอทานอลของบัวบก เทคนิค TLC คือ เฟสเคลื่อนที่ ใช้ เมทานอลในคลอโรฟอร์ม โดยมี spraying reagent คือ กรดซัลฟิวริกหลังจาก spray ด้วย spraying reagent แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเตาไฟฟ้าพบว่าเกิดจุดสีน้ำตาลขึ้นหลายจุด แสดงว่าสารประกอบในสารสกัดที่ได้น่าจะมีองค์ประกอบไตรเทอร์ปีนที่มีโครงสร้างเป็นไกลโคไซด์เนื่องจากกรดซัลฟิวริกทำปฏิกิริยากับไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์เกิดสีน้ำตาล (Hostettmann and Marson, 1995)

Phongjit (2003) นำเทคนิค TLC มาใช้ยืนยันการตรวจสอบสารสกัดเอทานอลจากบัวบก โดยสภาวะที่ใช้ในการแยกสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัดเอทานอล คือ เฟสเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (15:7:1 v/v/v) โดยมี spraying reagent คือ anisaldehyde ในกรดซัลฟิวริก หลังจาก spray ด้วย spraying reagent แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยการระบุสารไตรเทอร์ปีนระบุโดยการเปรียบเทียบสี และค่า Retention factor (R_f) จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเอเชียติโคไซด์กับสารไตรเทอร์ปีนในสารสกัดเอทานอลด้วยเทคนิค TLC พบสารหรือจุดขึ้นตรงกับสารมาตรฐานเอเชียติโคไซด์ที่ R_f 0.55-0.58 และสีของสารมาตรฐานเอเชียติโคไซด์กับสารหรือจุดของสารสกัดเอทานอลมีสีน้ำตาลเหมือนกัน

Sribusarakum (1997) นำเทคนิค TLC ตรวจสอบสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัดบัวบกในยาสำเร็จรูปโดยสภาวะที่ใช้ในการแยกสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัดเอทานอลจากบัวบก คือ เฟสเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (15:7:1 v/v/v) และคลอโรฟอร์ม-เมทานอล (9:1 v/v) โดยมี spraying reagent คือ แอนโทรนรีเอเจนต์ในกรดซัลฟิวริก หลังจาก spray ด้วย spraying reagent แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที พบว่าการใช้เฟสเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (15:7:1 v/v/v) สามารถแยกสารสกัดไตรเทอร์ปีนของสารสกัดบัวบก สารมาตรฐานผสม และสารสกัดบัวบกในยาสำเร็จรูปได้ดีกว่า โดยสารไตรเทอร์ปีนที่แยกได้แก่ เอเชียติโคไซด์ กรดเอเชียติก กรดมาเดคาสสิก และ กรดเทมิโนลิก และเมื่อตรวจสอบสเปกตรัมของสารที่สารเคลื่อนที่พบว่าเอเชียติก เคลื่อนที่ไกลสุด รองลงมาคือ กรดเทมิโนลิก และ เอเชียติโคไซด์ ตามลำดับ

Hengsawas (2004) นำเทคนิค TLC ในการแยกสารสกัดบัวบกในการทำเม็ดยาเคลือบ โดยสภาวะที่ใช้ในการแยกสารไตรเทอร์ปีนของตัวอย่างบัวบกผง และสารมาตรฐานไตรเทอร์ปีน ที่ประกอบด้วย เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และ กรดเอเชียดิก คือ เฟสเคลื่อนที่ เอทิลอะซิเตต-เมทานอล-น้ำ (7.5:2.5:1 v/v) โดยมี spraying reagent คือ 10 %กรดซัลฟิวริกในเมทานอล หลังจาก spray ด้วย spraying reagent แล้วนำไปให้ความร้อน ด้วยลมร้อน เป็นเวลา 15 นาที จากผลการทดลองเมื่อแยกองค์ประกอบสารไตรเทอร์ปีนในตัวอย่างผงบัวบก และสารมาตรฐานผสม (เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียดิก) พบว่าองค์ประกอบของสารในตัวอย่างผงของสารไตรเทอร์ปีนจากบัวบกมีตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐานบัวบกทั้ง 3 ชนิด ค่า R_f ของสารมาตรฐาน เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียดิกคือ 0.40 0.70 และ 0.75 ตามลำดับ

Pramongkit (1995) นำเทคนิค TLC ระบุชนิดของสารสำคัญกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบกโดยใช้ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (15:7:1 v/v/v) คลอโรฟอร์ม-เมทานอล (9:1 v/v) โดยมี spraying reagent คือ 0.2 % แอนโทรอนรีเอเจนต์ ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นแล้วนำไปให้ความร้อนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกสารสกัดไตรเทอร์ปีนของสารสกัดบัวบก และสารมาตรฐานผสม โดยสารไตรเทอร์ปีนที่แยก ได้แก่ เอเชียดิโคไซด์ กรดเอเชียดิก กรดมาเดกาสติก และ มาเดกาสโซไซด์

การออกฤทธิ์ทางเภสัชของสารไตรเทอร์ปีน

1. การรักษาบาดแผล (Wound healing effects)

มีการศึกษามากมายที่สนใจผลกระทบของบัวบกต่อการรักษาบาดแผล โดยมีการศึกษาในสิ่งมีชีวิต คนหรือ สัตว์ และในหลอดทดลองซึ่งใช้ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ของมนุษย์ (Lawrence, 1967; Tenni *et al.*, 1988; Marquart *et al.*, 1990; Vogel *et al.*, 1990; Sunikumar *et al.*, 1998; Shukla *et al.*, 1999) สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ของสารสกัดบัวบกต่อการรักษาบาดแผล ซึ่งพบความสัมพันธ์ของการกระตุ้นการรักษาบาดแผลผิวหนังด้วยการลดอาการโป่งหรือบวม (Vogel *et al.*, 1990) ซึ่งการเพิ่มของการสังเคราะห์คอลลาเจน ปริมาณ fibronectin mitotic activity ของ germ layer และการเพิ่มของ keratan hyaline ในเนื้อเยื่อของแผลเป็นยังขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัดไตรเทอร์ปีนที่ได้รับ (Lawrence, 1967; Tenni *et al.*, 1988; Marquart *et al.*, 1990; Vogel *et al.*, 1990; Sunikumar *et al.*, 1998; Shukla *et al.*, 1999)

Marquart *et al.* (1990) ทดสอบคุณสมบัติการรักษาบาดแผลของสารสกัดบัวบก (TECA, tritirated extract of *C. asiatica*) ต่อไฟโบรบลาสต์ของคนที่ทำการเตรียมและเพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ในหลอดทดลอง จากผลการตรวจสอบคุณสมบัติการรักษาบาดแผลของสารสกัดบัวบกพบว่าปริมาณสารสกัดบัวบกมีผลต่อการสังเคราะห์คอลลาเจนและปริมาณโพลีลีนอิสระ (free proline) เพิ่มขึ้น แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกการสังเคราะห์คอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นด้วย TECA

Tenni *et al.* (1988) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของคุณสมบัติการรักษาบาดแผลในไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังคนเมื่อนำสารสกัดบัวบกที่มีสารประกอบไตรเทอร์ปีน (containing TTCA, total triterpenoid fraction of *C. asiatica*) ไปทดสอบ พบว่ามีการเพิ่มของการสังเคราะห์คอลลาเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีการเพิ่มปริมาณไฟโบรินภายในเซลล์

Lawrence (1967) ทดสอบการรักษาบาดแผลและอัตราการตายของหนูด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการไหม้ของผิวหนัง และแผลภายในเยื่อช่องท้องด้วยสารผสมเอเซียติโคไซด์ จากการศึกษาพบว่าการรักษาบาดแผลจากไหม้และอัตราการตายของหนูระหว่างสารผสม เอเซียติโคไซด์ และสารควบคุม (saline solution/ propylene glycol) ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และไม่มีผลต่อการรักษาบาดแผลผิวหนังปกติ แต่ในกรณีผิวหนังที่เกิดแผลพุพอง แผลจากโรคเรื้อน พบว่าสารสกัดบัวบกผสมเอเซียติโคไซด์ มีผลต่อการสมานบาดแผล

Vogel *et al.* (1990) ศึกษาผลกระทบของการรักษาบาดแผลของสารสำคัญในบัวบกซึ่งประกอบด้วยกรดไตรเทอร์ปีน (triterpene acid) และไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (triterpene glycoside) (เอเซียติโคไซด์ มาเดกาสโซไซด์ กรดเอเซียติก และกรดมาเดกาสติก) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหนูโดยการกินและการฉีดกรดไตรเทอร์ปีน (triterpene acid) และไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์เข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลอง จากผลการทดสอบพบว่าหลังจากฉีดเข้าใต้ผิวหนังไปแล้ว 3 สัปดาห์ น้ำหนักของ granuloma เนื้อเยื่อแผลเป็นลดลงตามปริมาณของสารที่ฉีดเข้าไป และมีค่าแรงฉีกขาด (rupture strength) กับแรงที่ใช้ในการดึงยึดเพิ่มขึ้น (tensile strength) การเพิ่มของค่าแรงทั้ง 2 มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณคอลลาเจนในเนื้อเยื่อแผลเป็น เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อควบคุมซึ่งไม่มีบาดแผล ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่การเพิ่มปริมาณคอลลาเจนจะช่วยส่งเสริมคุณสมบัติการรักษาแผลเนื้อเยื่อ และเมื่อให้หนูทดลองกินกรดไตรเทอร์ปีน และไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์พบว่ากรดไตรเทอร์ปีน (กรดเอเซียติกและ กรดมาเดกาสติก) ให้ผลดีกว่าไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์

(เอเซียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้ง 4 ชนิดให้ผลในการรักษาที่ดี

Sunilkumar *et al.* (1998) ศึกษาผลกระทบของสารสกัดบัวบกจากหลายรูปแบบ (แบบเจล ครีม น้ำมัน) ต่อบาดแผลเปิดของหนูทดลอง พบว่าเมื่อนำไปทดสอบกับบาดแผลเปิดของหนูทดลอง เป็นเวลา 24 วัน วันละ 3 ครั้ง สารสกัดบัวบกทั้ง 3 แบบช่วยเพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจนและเพิ่ม ปริมาณของเซลล์ที่บริเวณบาดแผล โดยเมื่อเปรียบเทียบกับบาดแผลที่ไม่ได้ใช้สารสกัดพบว่า การ รักษาเย็บและอัตราการหดตัวของบาดแผลจะเร็วกว่า สำหรับสารสกัดบัวบกที่อยู่ในรูปของเจลจะมี ประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีกว่าสารสกัดในรูปของครีมและน้ำมัน

Shukla *et al.* (1990a) พบว่าเมื่อนำ 0.2 % เอเซียติโคไซด์ในสารละลาย และให้หนูตะเภา กินเอเซียติโคไซด์ ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกัน คือ ปริมาณ hydroxyproline เพิ่มขึ้น 56 % tensile strength 57% ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้น และเย็บ บวบนั้บริเวณบาดแผลดีขึ้นกว่าตัวอย่างควบคุม

การทดลองนำสารสกัดของใบบัวบก ซึ่งเรียกว่า madecassol และสารที่สกัดได้จากบัวบก คือ เอเซียติโคไซด์ กรดเอเซียติก และกรดมาเดคาสสิกซึ่งเป็นสารกลุ่มไตรเทอร์ปีน ใช้ทาภายนอก เพื่อรักษาแผลในหนูขาว พบว่าทำให้แผลหายเร็ว เนื่องจากทำให้มีการกระจายตัวของหนองในแผล และทำให้แผลเป็นขนาดเล็กลง (Tsurumi *et al.*, 1973) และ Poizot and Dumez (1978) พบว่าเมื่อ ให้หนูขาวกินไตรเทอร์ปีนขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม จะมีผลในการรักษา แผล โดยการสร้างผิวหนังขึ้นนอกเร็วขึ้น และบาดแผลเล็กลง

สารสกัดบัวบกซึ่งมีสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนเป็นส่วนประกอบหลัก มีฤทธิ์เร่งการ สมานแผลเมื่อใช้ทาที่แผล โดยพบว่าได้ผลทั้งในหนูขาวและคน (Kaito *et al.*, 1973) การให้กินก็ ให้ผลดีเช่นกันทั้งในหนูขาว (Poizot and Dumez, 1978) และคน (Montecchio *et al.*, 1991)

สารสกัดบัวบกด้วย 50 %เอทานอลมีฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร เมื่อทดลองกับหนู ขาว (Chatterjee *et al.*, 1992) การทดลองในคนก็พบว่าบัวบกใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและ ลำไส้ได้เช่นเดียวกัน (Shin *et al.*, 1982)

2. ป้องกันและรักษาการเกิดอักเสบที่แผล

Chatterjee *et al.* (1992) พบว่าเมื่อนำสารสกัดบัวบกจากแอลกอฮอล์ ทดสอบกับหนูทดลอง มีผลต่อการช่วยเร่งการสมานแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้

เมื่อให้หนูกินสารสกัดบัวบกจากแอลกอฮอล์ในปริมาณ 0.05, 0.25 และ 0.50 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม พบว่ามีผลต่อการยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร 58%-82% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดบัวบกจากแอลกอฮอล์ทำให้เยื่อผนังกระเพาะอาหารแข็งแรงขึ้นและลดการทำลายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Chen and Koo, 2000)

3. ระบบประสาท

Supawantanakul (2003) พบว่าเอเชียดิโคไซด์มีทั้งผลป้องกันประสาทและความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเมื่อทดสอบกับเซลล์ประสาทแกลนูลาเพาเลียงจากสมองซีรีเบลลัม โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอเชียดิโคไซด์และระยะเวลาสัมผัส ผลป้องกันเซลล์ประสาทจะปรากฏชัดภายใต้สภาวะที่จำเพาะเจาะจงเท่านั้น ได้แก่ การสัมผัสล่วงหน้ากับเอเชียดิโคไซด์ 1 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การสัมผัสอย่างจำเพาะดังกล่าว สามารถป้องกันการตายจากสภาวะ K^+ ด่ำที่เกิดกับเซลล์ประสาทแกลนูลาเพาเลียง นอกจากนั้นยังมีผลกระตุ้นการทำงานของไมโทคอนเดรีย ลดระดับ lipid peroxidation ของเซลล์ ในขณะที่เซลล์ประสาทสัมผัสมาอยู่ในสภาวะ K^+ ด่ำ นอกจากนี้อาจมีผลต่อการเสริมสร้างปริมาณ glutathione ที่ลดลงจากสภาวะ K^+ ด่ำได้บ้าง อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของผลทั้งสองแบบที่เกิดจากเอเชียดิโคไซด์ซึ่งมีต่อเซลล์ประสาทเฉพาะเลียงยังไม่ทราบชัดในปัจจุบัน

สารสกัดน้ำจากบัวบกมีฤทธิ์ลดปริมาณสาร norepinephrine เร่งการทำลายสาร dopamine และ serotonin ในสมองหนูขาว ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่ควบคุมการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง (Nalini *et al.*, 1992) สารสกัดจากทุกส่วนของบัวบกมีฤทธิ์เพิ่มความจำและเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้เมื่อให้หนูถีบจักรกิน (Kulkarni and Erema, 1992)

สารสกัดด้วยเอทานอล (Sikina and Dandiya, 1990; Adesina, 1982) และน้ำมีฤทธิ์ด้านการชักและกดประสาทส่วนกลาง แต่รายงานบางฉบับก็รายงานว่าสารสกัด 50 % เอทานอลไม่มีฤทธิ์ด้านการชักและกดประสาทส่วนกลาง (Dhar *et al.*, 1968) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วย 60 % เอทานอลนี้มีฤทธิ์ด้านอาการซึมเศร้าในหนูขาว (Sakina and Dandiya, 1990)

สารสกัดเอทานอลจากบัวบกมีฤทธิ์กล่อมประสาท (Gupta, 1962) และเมื่อทดสอบกับหนูถีบจักรและกระต่ายด้วยสารไตรโทปีนไกลโคไซด์ (Ramaswamy *et al.*, 1970) และสารบราห์โมไซด์ (Brahmoside) (Rastogi and Dhar, 1963) พบว่ามีฤทธิ์กล่อมประสาท เช่นกัน

4. ผลกระทบต่อหัวใจและหลอดเลือดหัวใจ

ไกลโคไซด์จากบัวบกมีผลทำให้อัตราการเต้นของหัวใจช้าลง โดยพบว่าออกฤทธิ์เมื่อนิดเข้าทางหลอดเลือดดำของกระต่าย สุนัข และหนูขาว นอกจากนี้ยังมีผลให้ความแรงในการบีบของหัวใจกระต่ายลดลงด้วย (Sangsirinavin, 1978) ส่วนของไกลโคไซด์จากบัวบกมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดเมื่อทดลองกับกระต่าย (Sangsirinavin, 1978; Dhorrarintra and Sangsirinavin, 1979)

สารสกัดเอทานอลจากบัวบกทั้งต้นมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตของหนูขาวเมื่อนิดเข้าทางหลอดเลือดดำ (Ramaswamy *et al.*, 1970) น้ำคั้นจากต้นของบัวบกและสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูขาวและสุนัข ซึ่งพบว่าส่วนที่ออกฤทธิ์คือส่วนของไกลโคไซด์ในขณะที่ส่วนของอัลคาลอยด์ไม่ได้ผล (Sangsirinavin, 1978)

เมื่อให้ผู้ป่วยด้วยโรคโลหิตสูงเรื้อรัง 87 คนกินสารสกัดบัวบกในปริมาณ 60 และ 120 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิตสูง และไม่พบผลข้างเคียง (Cesarone *et al.*, 1994)

สมบัติที่สำคัญของสารไตรเทอร์ปีนจากบัวบก

1. สมบัติการต้านจุลินทรีย์และไวรัส

ข้อมูลทางเภสัชพบว่าบัวบกสามารถต้านแบคทีเรีย *Pseudomonas pyocyaneus*, *Trichoderma mentagrophytes* และ *Entamoeba histolytica* (Tschesche and Wulff, 1965; Dhar *et al.*, 1968) และ สารสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ของบัวบกสามารถต้านไวรัสชนิด *Herpes simple II*

Dhar *et al.* (1968) ตรวจสอบคุณสมบัติการต้านไวรัส จุลินทรีย์ เชื้อรา พยาธิ โปรโตซัว ของสารสกัดแอลกอฮอล์ พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ *Entamoeba histolytica* เพียงอย่างเดียว

Zheng (1989) ทดสอบประสิทธิภาพการต้านไวรัสของสารสกัดแอลกอฮอล์และน้ำจาก บัวบก พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ ไวรัสชนิด *Herpes simple II* ในระยะ logarithm

ชัยเดช และคณะ (2548) ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของเด้านมอักเสบใน โคนมของสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดใบฝรั่งจีนก (*Psidium guajava* Linn.) เปลือก มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) หัวขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* Linn.) บัวบก (*Centella asiatica* Linn. Urban) และใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Bur. f. Nees) โดยได้ทำการทดสอบ กับเชื้อ *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus uberis* coagulase negative bacteria staphylococci (CNS) และ coliforms ซึ่งพบว่าสารสกัดใบฝรั่งจีนก สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* CNS และ *E. coli* ได้ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และพบว่าเปลือกมังคุด หัวขมิ้นชัน บัวบก มีผลการยับยั้งเชื้อคล้ายใบฝรั่งจีนก แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*

2. สมบัติการต้านมะเร็ง

Park *et al.* (2004) ศึกษาสารสำคัญกรดเอเชียดิกของบัวบก ในการเหนี่ยวนำทำให้ เซลล์มะเร็งผิวหนังของชนิด SK-MEL-2 เกิด apoptosis ด้วยกลไกการผลิตเอนไซม์ caspase-3 ทำลาย DNA ของเซลล์มะเร็งจะทำให้เซลล์มะเร็งตาย จากผลการทดลอง พบว่ากรดเอเชียดิก มี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนังของคนชนิด SK-MEL-2 โดยจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารกรดเอซีติก

Bunpo *et al.* (2005) ศึกษาผลของสารสกัดจากบัวบกในการต้านเนื้องอกและการหยุดการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคนชนิด CACO-2 จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากบัวบกสามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด CACO-2 โดยประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด CACO-2 ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดจากบัวบก

สารสกัดอะซิโตนจากบัวบก (acetone) มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง lymphoma-Dalton's (Babu *et al.*, 1995) สารสกัดเมทานอลจากบัวบกมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง cells-Raji (Murakami *et al.*, 1995)

3. สมบัติการต้านออกซิเดชัน

บัวบกมีสารสำคัญหลายชนิดที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันที่สำคัญ เช่น บีต้า-แคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบไตรเทอร์ปีน กลอโรฟิลล์ และอื่นๆ

Hamid *et al.* (2002) ศึกษาผลของตัวทำละลายต่างชนิดกัน (เอทานอล น้ำ และไลโทปีโตรเลียม (Light petroleum) บัวบกส่วนต่างๆ (ราก ใบ และก้าน) อุณหภูมิ (30, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส) และค่าความเป็นกรด-เบส (pH 1-11) ต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบก จากผลการทดลองพบว่าเมื่อนำสารสกัดบัวบกที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน วัดสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Conjugated diene เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน α -tocopherol พบว่าสารสกัดเอทานอลจากทุกส่วน (ราก ใบ และก้าน) มีสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดน้ำและไลโทปีโตรเลียม ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าสารสำคัญในบัวบกที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันเป็นสารประกอบที่สามารถละลายน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดเอทานอลจากราก ก้าน และรากของบัวบกด้วยวิธี 2-Thiobarbituric acid สารสกัดเอทานอลจากราก แสดงสมบัติต้านออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอลจากราก ใบ และก้าน ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดเอทานอลของทุกส่วน (ราก ใบ ก้าน) บ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (30, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส) สารสกัดเอทานอลของทุกส่วน จะมีความคงตัวตั้งแต่อุณหภูมิที่ 30จนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกตัวอย่าง ($p < 0.05$) และพบว่าที่

pH เท่ากับ 7 สารสกัดบวบก็มีสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด จากผลดังกล่าวมีนัยว่า pH 7 เป็น pH ของสารประกอบในบวบที่แสดงสมบัติด้านการออกซิเดชัน

Zainol *et al.* (2003) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของราก ใบ ก้านของ บวบ 4 พันธุ์ (CA 01, CA 05, CA 08 และ CA 11) จากประเทศมาเลเซีย โดยในงานวิจัยนี้ใช้วิธี Ferric thiocyanate (FTC) และ Thiobarbituric acid (TBA) ตรวจสอบคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดบวบ ซึ่งวิธี FTC จะวัดการเกิดอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ในขั้นเริ่มต้นของปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการหืนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ส่วนวิธี TBA จะวัดในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation เป็นขั้นตอนที่เกิดการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระสองโมเลกุล ทำให้เกิดสารประกอบที่คงตัว ซึ่งจะสลายตัวให้สารประกอบที่มีจำนวนคาร์บอนต่ำ เช่น อัลดีไฮด์ คีโตน และกรดระเหยง่าย ทำให้เกิดกลิ่นหืนในอาหาร (Chan, 1987) จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดเมทานอลในแต่ละพันธุ์และแต่ละส่วน (ราก ใบ และก้าน) ของบวบ พบว่าพันธุ์ต่างชนิดกันสมบัติการต้านออกซิเดชันก็แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสารสกัดเมทานอลจากใบของทุกสายพันธุ์แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด หลังจากนั้นเมื่อนำสารสกัดบวบมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Total phenols พบว่าสารสกัดจากใบของบวบในทุกพันธุ์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด (8.13-11.7 กรัมต่อ 100 กรัมแห้ง) รองลงมาคือสารสกัดจากราก (6.46-10.5 กรัมต่อ 100 กรัมแห้ง) สารสกัดจากก้าน บวบพบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุด (3.23-4.91 กรัมต่อ 100 กรัมแห้ง) ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติการต้านออกซิเดชันไปในทางเดียวกัน ($r^2=0.9$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะเป็นสารสำคัญในบวบที่แสดงคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน

อนุมูลอิสระ (free radical) ในร่างกายและแหล่งที่มา

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลหรืออนุภาคที่มีอิเล็กตรอน (electron) ที่ไม่มีคู่อยู่เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากการรับหรือขาดอิเล็กตรอนไปหนึ่งตัว โดยปกติธาตุต่างๆที่อยู่ในโมเลกุลที่เสถียรจะต้องมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่มีการสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนมาอีกหนึ่งตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่เสถียรและมีความว่องไวมาก สำหรับร่างกายของคนเรานั้นความไม่เสถียรของอนุมูลอิสระถือว่าเป็นปัญหาหรืออันตรายอย่างมาก ก่อให้เกิดความผิดปกติต่างๆใน

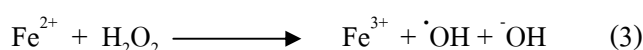
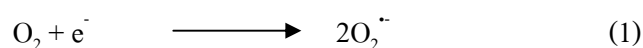
ร่างกาย ทั้งนี้เพราะอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลปกติโดยการดึงอิเล็กตรอนมาหนึ่งตัว ทำให้โมเลกุลปกตินั้นขาดอิเล็กตรอนและกลายเป็นอนุมูลอิสระที่เป็นปัญหาแทน ทำให้ต้องไปแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นไปเรื่อยๆ ยกเว้นในกรณีที่อนุมูลอิสระนั้นมารวมตัวกันเป็นโมเลกุลที่เสถียรขึ้น จึงจะเป็นการหยุดวงจรของอนุมูลอิสระ (Pastor *et al.*, 2000)

ในระบบของสิ่งมีชีวิตโดยส่วนใหญ่แล้วจะพบอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไวมาก เรียกว่า “Reactive Oxygen Species” หรือ ROS เช่น hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$), superoxide ($\text{O}_2\cdot^-$) รวมทั้ง singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) และเป็นอนุพันธ์ของไนโตรเจน ที่เรียกว่า “Reactive Nitrogen Species” หรือ RNS เช่น nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) และ peroxyxynitrite anion (ONOO^-) เป็นต้น อนุมูลอิสระโดยเฉพาะ ROS เป็นอันตรายต่อระบบในร่างกายของคนเราเป็นอย่างมาก เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถสร้างความเสียหายให้แก่ กรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมัน อนุมูลอิสระที่สำคัญได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ ($\text{O}_2\cdot^-$) ไนตริกออกไซด์ ($\cdot\text{NO}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล ($\cdot\text{OH}$) โดยอนุมูลไฮดรอกซิลนี้จะมีคามว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากที่สุด มีเวลาครึ่งชีวิตในสารละลายน้ำ 1 นาโนวินาที สามารถทำปฏิกิริยาได้โดยตรงกับกรดนิวคลีอิก สายโซ่กรดอะมิโนในโปรตีนและพันธะคู่ในกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Pastor *et al.*, 2000) ส่วนไนตริกออกไซด์นั้นจะมีความเสถียรมากกว่า โดยมีเวลาครึ่งชีวิตประมาณ 2-3 วินาที ปกติจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับโมเลกุลออกซิเจน (O_2) แต่ถ้าไนตริกออกไซด์ไปรวมตัวกับซูเปอร์ออกไซด์จะเกิดเป็น peroxyxynitrite anion ซึ่งมีความว่องไวมากกว่า สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนและโมเลกุลขนาดใหญ่อื่นๆ ในร่างกาย คล้ายกับอนุมูลไฮดรอกซิลแหล่งที่มาของอนุมูลอิสระที่สร้างปัญหาให้กับร่างกายคนเรามี 2 แหล่งคือ

1. แหล่งภายในร่างกาย (Endogenous) มาจากหลายแหล่งที่สำคัญ คือ ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) กระบวนการเผาผลาญอาหารของ cytochrome P450, peroxisomes และ กระบวนการกำจัดเชื้อโรคของเซลล์เม็ดเลือดขาว (neutrophils eosinophils และ macrophages) โดยพบว่าไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งที่ผลิตอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยเฉพาะซูเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากการที่ไมโทคอนเดรียใช้ออกซิเจนในการผลิตพลังงาน โดยพบว่าโมเลกุลออกซิเจนประมาณ 4-5% จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ROS (Pastor *et al.*, 2000)

สำหรับกลไกการเกิดอนุมูลอิสระนี้เริ่มจากปฏิกิริยารีดักชันของโมเลกุลออกซิเจนด้วยหนึ่งอิเล็กตรอนเกิดเป็นซูเปอร์ออกไซด์ (สมการที่ 1) และซูเปอร์ออกไซด์ สามารถรวมตัวกันเองเกิด

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมีเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) เป็นตัวเร่ง (สมการที่ 2) จากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกออกซิไดซ์โดยโลหะในร่างกาย เช่น Fe (II) ให้กลายเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลที่ว่องไว เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton Reaction (สมการที่ 3) ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายอย่างมาก เนื่องจากปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ในนิวเคลียสของเซลล์และนำไปสู่การทำลายดีเอ็นเอ นอกจากนั้น Fe (III) ที่เกิดขึ้นยังสามารถช่วยเร่งปฏิกิริยา Harber-Weiss reaction ระหว่างซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เกิดเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลเพิ่มมากขึ้นอีก (สมการที่ 4) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวก็คือการรวมกันของปฏิกิริยา Fenton กับปฏิกิริยารีดักชันของ Fe (III) ด้วยซูเปอร์ออกไซด์ ให้ Fe (II) กลับคืนมาพร้อมกับโมเลกุลออกซิเจน (สมการที่ 5)



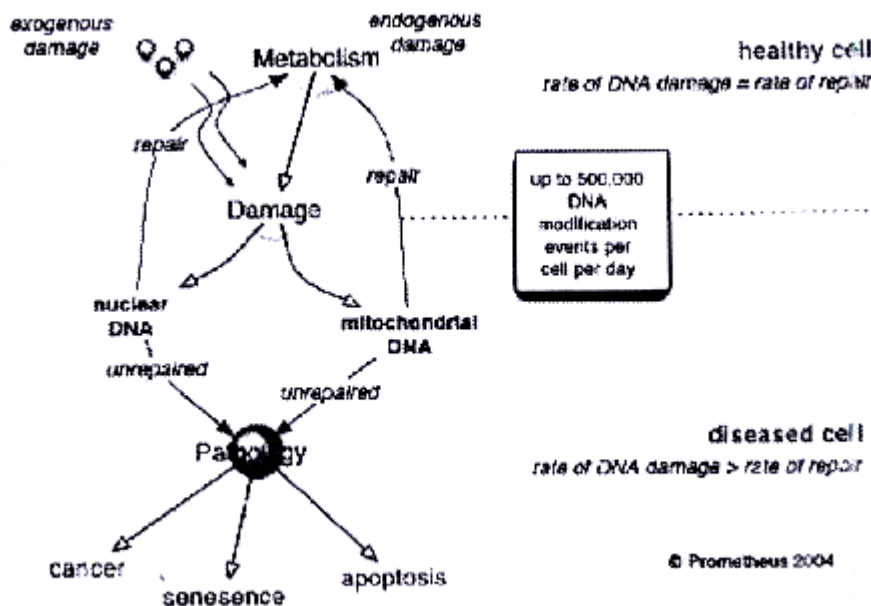
2. แหล่งภายนอกร่างกาย (Exogenous) พบว่าสารเคมีต่างๆจากสิ่งแวดล้อมสามารถก่อให้เกิด ROS ขึ้นในเซลล์ได้ทั้งโดยตรงและทางอ้อมสารเหล่านี้ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น คาร์บอนหริ์ แสงแดด ความร้อน รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา โลหะไอออน สารประกอบพวกลาโลเจน (เช่น CCl_4 , CHCl_3) อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรืออาหารที่มีธาตุเหล็กมากกว่าปกติ และยาระงับประสาท เป็นต้น (Pastor *et al.*, 2000)

อนุมูลอิสระและการเกิดเซลล์มะเร็ง

ROS และ RNS นั้นมีสองบทบาทในระบบของร่างกาย กล่าวคือ มีทั้งประโยชน์และโทษ ประโยชน์ของอนุมูลอิสระคือช่วยป้องกันการติดเชื้อ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวจะใช้อนุมูลอิสระนี้ในการฆ่าแบคทีเรียหลังจากที่เซลล์กินแบคทีเรียเข้าไปแล้ว แต่ในทางตรงกันข้าม ถ้าร่างกายมีอนุมูลอิสระเหล่านี้ในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะ ROS จะสามารถทำลายโครงสร้างเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นไขมันและเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid and membranes) โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะเรียกสภาวะการเข้าทำปฏิกิริยาของ ROS ที่โมเลกุลขนาดใหญ่นี้ว่า “oxidative stress” ซึ่งอาจให้คำนิยามได้ว่าเป็นสภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระมีปริมาณสูง

กว่า ส่งผลให้ปริมาณโดยรวมของ ROS ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น (Poli *et al.*, 2004) และเป็นสาเหตุที่นำไปสู่การเกิดโรคต่างๆในระยะยาว เช่น โรคมะเร็ง (cancer) โรคต่างๆที่เกี่ยวกับหลอดเลือดในหัวใจ (cardiovascular disease) โดยเฉพาะโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน (arteriosclerosis) โรคเกี่ยวกับข้อต่อกระดูก (arthritis) โรคความจำเสื่อม (alzheimer) เป็นต้น

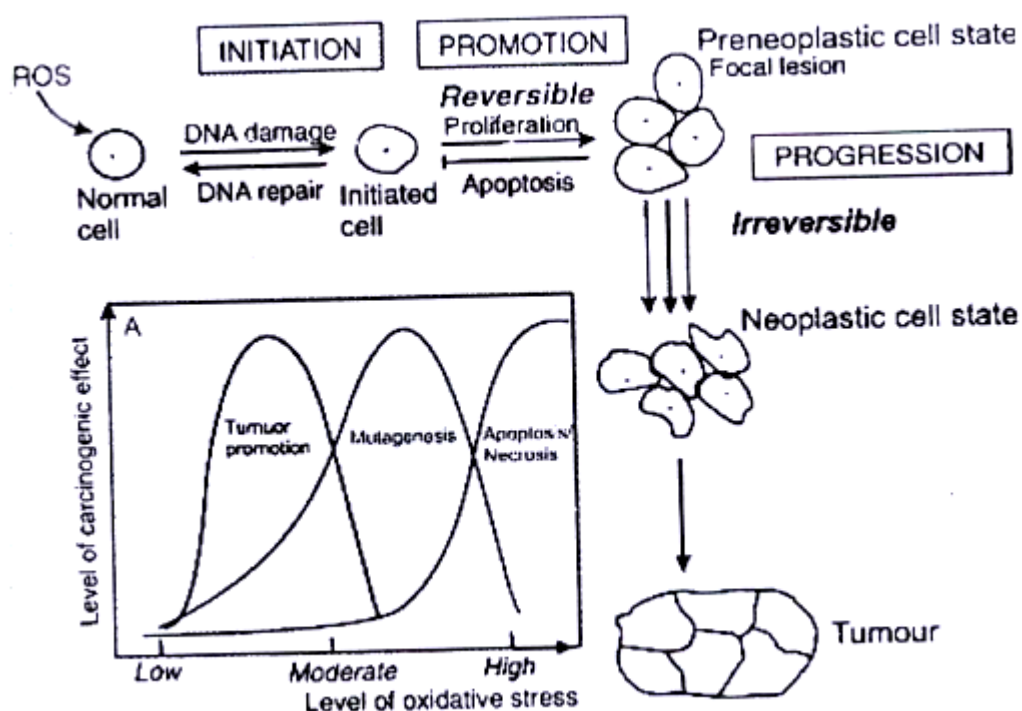
ปัจจัยทั้งจากภายนอกและภายในร่างกายที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ (DNA damage) การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) และการตายของเซลล์ (cell death) ล้วนส่งเสริมการเกิดโรคมะเร็งทั้งสิ้น ในสภาวะปกติจำนวนของเซลล์ในเนื้อเยื่อนั้นจะต้องมีความสมดุลระหว่างจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและเซลล์ที่ตาย เมื่อดีเอ็นเอถูกทำให้เสียหาย ระบบในร่างกายก็จะดำเนินการซ่อมแซม (DNA repair) แต่ถ้การซ่อมแซมทำได้ไม่เพียงพอ เซลล์ก็จะทำลายตัวเองอย่างมีแบบแผนโดยไม่ส่งผลกระทบของ DNA damage และการกลายพันธุ์ (mutation) ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ดังนั้นถ้ามีการเสื่อมถอยของ DNA repair ประกอบกับการลดลงของการทำลายตัวเองของ DNA damage ก็สามารถก่อให้เกิดโรคมะเร็ง และโรคอื่นๆตามมา (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การเกิด DNA damage และ DNA repair

ที่มา: Buhler and Miranda (2000)

กระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง (carcinogenesis) เป็นกระบวนการหลายขั้นตอนที่ซับซ้อนในการเปลี่ยนแปลงเซลล์จากสภาวะปกติให้กลายเป็นสภาวะก่อนเป็นเซลล์มะเร็งและกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (Trueba *et al.*, 2004) กลไกที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับการที่โครงสร้างของดีเอ็นเอถูกทำให้เสียหายและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ในแบบที่ควบคุมไม่ได้โดยมีสารก่อมะเร็งเข้ามามีส่วนร่วมในหลายขั้นตอนของกระบวนการ เราสามารถแบ่งสารก่อมะเร็งออกเป็นสองประเภทตามบทบาทที่กระทำ คือ genotoxic และ epigenetic (non- genotoxic) โดยสารประเภท genotoxic นั้นเป็นสารเคมีที่ทำความเสียหายแก่ดีเอ็นเอโดยตรงและนำไปสู่การกลายพันธุ์ ส่วนสารพวก non- genotoxic นั้นจะมีบทบาทต่อพวกที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอหรือส่งผลทางอ้อมต่อดีเอ็นเอ โดยที่สารเหล่านี้จะควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และการตายของเซลล์ ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้อนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด



ภาพที่ 6 รูปแบบ 3 ขั้นตอนของการเกิดเซลล์มะเร็งและความสัมพันธ์ของระดับขั้นในการเกิดเซลล์มะเร็งกับระดับปริมาณของอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่างๆของการเกิดเซลล์มะเร็ง (ในกรอบภาพ A)

ที่มา: Valko *et al.* (2006)

ในการพัฒนาสู่การเกิดโรคมะเร็งนั้นประกอบด้วยอย่างน้อย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นเริ่มต้น (initiation) ขั้นส่งเสริม (promotion) และขั้นพัฒนาการ (progression) (Klaunig and Kamendulis, 2004; Valko *et al.*, 2006) ดังแสดงในภาพที่ 6

ในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการนั้นเกี่ยวข้องกับการเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอที่ถูกดัดแปลงจะได้รับการซ่อมแซม โดยเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวนั้นถูกทำให้เสียหายด้วยสาเหตุใดก็ตาม จะสามารถขัดขวางวงจรเซลล์ (cell cycle) ได้ชั่วคราว ชะลอการซ่อมแซมความเสียหายและการกลับเข้าสู่การแบ่งเซลล์ ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดเนื่องมาจากการกระทำของ ROS ที่เกิดผ่านกลไกของปฏิกิริยา Fenton เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล และอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่กล่าวไว้ข้างต้น

ขั้นตอนการส่งเสริมเป็นการขยายตัวโดยการคัดลอกเซลล์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงในขั้นเริ่มต้น โดยการเพิ่มจำนวนผ่านการแบ่งเซลล์ที่ควบคุมไม่ได้ และหรือชะลอการฆ่าตัวตายของเซลล์อย่างมีแบบแผน ขั้นตอนนี้เกิดย้อนกลับได้โดยการขัดสิ่งกระตุ้นที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอกออกไป แต่อย่างไรก็ตาม สารที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอกหลายชนิดสามารถต้านทานต่อสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในเซลล์ได้และถ้าระดับของ oxidative stress มีต่ำก็จะกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ในขั้น promotion นี้ได้ คือเป็นการกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้องอก (tumor) นั้นเอง (กรอบภาพ A ในรูปที่ 1) สิ่งเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการที่มี ROS ในขั้นนี้เป็นการส่งเสริมการเกิดเนื้องอก และก็เป็นวิธีหลักของ ROS ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็ง

ระยะสุดท้ายเป็นขั้นพัฒนาการ เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และโมเลกุลจากสภาวะ preneoplastic ไปเป็น neoplastic (หรือ tumor) ขั้นนี้เป็นขั้นที่เกิดแบบไม่ย้อนกลับ (irreversible) โดยเป็นการสะสมเพิ่มพูนของยีนถูกทำให้เสียหายเกี่ยวพันกับความไม่เสถียรของยีนและการทำลายความแข็งแรงของโครโมโซม

สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidants) กับการป้องกันมะเร็ง

ภายใต้สภาวะปกติร่างกายจะมีกลไกการปรับสมดุลของการผลิตอนุมูลอิสระ โดยสารต้านออกซิเดชันจะไปจับกับอนุมูลอิสระที่เป็นปัญหาแล้วเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรมากกว่าส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ๆ ขึ้นมาอีก เพราะอนุมูลอิสระจะรวมตัวกันเองกลายเป็น

โมเลกุลที่เสถียรบทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายใช้เพื่อช่วยรักษาสมดุลนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากการกำจัดอนุมูลอิสระออกไปโดยตรง จึงเป็นวิธีการป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในร่างกาย สารต้านออกซิเดชันในร่างกายของคนเรามีสองประเภท คือ ประเภทเอนไซม์และไม่เอนไซม์

1. สารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์ (Enzymatic antioxidants) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ของร่างกายที่สำคัญ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) และคะตะเลส (Mates *et al.*, 1999) เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งหลักที่ผลิตอนุมูลอิสระออกมา ออร์แกเนลล์นี้จึงเต็มไปด้วยสารต้านออกซิเดชันทั้งกลูตาไทโอน และเอนไซม์ต่างๆ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และ กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส โดยจะพบได้ทั้งในส่วนด้านนอกและด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อช่วยลดการเกิด oxidative stress ในระบบเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส นั้นจะมีอยู่ใน cytosol และไมโทคอนเดรีย โดยทำหน้าที่รีดิวซ์ไฮดรอกซิลเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีความว่องไวน้อยกว่า ส่วน glutathione peroxidase นั้นพบอยู่ใน cytosol และไมโทคอนเดรีย จะทำหน้าที่กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกไป ในขณะที่เอนไซม์คะตะเลสมีประสิทธิภาพสูงมากใน การเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและโมเลกุลออกซิเจน

แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ต่างๆที่ร่างกายใช้เพื่อต่อต้านอนุมูลอิสระนั้นมีปริมาณจำกัด ฉะนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยสารต้านออกซิเดชันจากแหล่งภายนอกร่างกายเพื่อรักษาระบบสมดุลต่างๆ ในร่างกายให้ดำเนินต่อไปได้อย่างปกติ และเราสามารถที่จะเลือกรับประทานอาหารหรือยาที่มีสารต้านออกซิเดชันได้

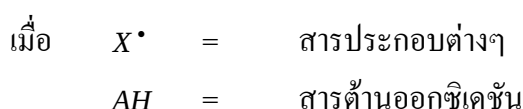
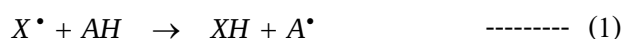
2. สารต้านออกซิเดชันที่ไม่เอนไซม์ (Non-enzymatic antioxidants) ที่สำคัญได้แก่ วิตามินซี (vitamin C) วิตามินเอ (vitamin A) คาโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารต้านอนุมูลอิสระพวกไทออล (thiol antioxidants) ได้แก่ glutathione, thioredoxin และ lipoic acid เป็นต้น (McCall *et al.*, 1999) สารเหล่านี้มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เช่น วิตามินอีจะทำปฏิกิริยากับชั้นไขมันส่วน lipoic acid นั้นสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและไขมัน จึงมีบทบาททั้งในเยื่อหุ้มเซลล์และใน cytosol นอกจากนี้สารต้านออกซิเดชันบางชนิดยังสามารถช่วยสร้างสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆให้กลับคืนมาใหม่ได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า antioxidant

network (Valko *et al.*, 2006) วงจรการทำงานและความสัมพันธ์กันของสารต้านออกซิเดชันชนิดต่างๆ

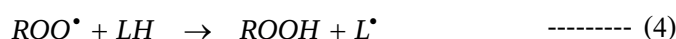
หลักการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชัน

วิธีการที่วัดการแลกเปลี่ยนอะตอมไฮโดรเจน (based on hydrogen atom transfer (HAT) reaction)

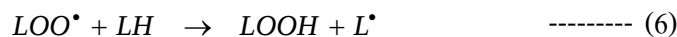
จากรายงานของ Huang *et al.* (2005) วิธีการนี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดการแข่งขันระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา โดยจะมีการกระตุ้นสารประกอบอะโซ (azo compounds) ด้วยความร้อนเพื่อให้เกิดการสลายตัวกลายเป็นอนุมูลเพอร์ออกซิลเพื่อเป็นตัวแทนอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ วิธีการในกลุ่มนี้ได้แก่ oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay และ total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay มีกลไกดังแสดงในสมการที่ 1 ซึ่งวิธีการกลุ่มนี้จะวัดปริมาณอะตอมไฮโดรเจนที่มีการแลกเปลี่ยน โดยจะวัดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ ที่ลดลงเมื่อเกิดการออกซิเดชัน เมื่อระบบมีสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันจะไปแย่งจับอนุมูลเพอร์ออกซิล ส่งผลให้ความเข้มสารฟลูออเรสเซนต์ลดลงด้วยความเร็วที่ช้าลง ส่วนกลไกในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันมี 4 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นเริ่มต้น (Initiation stage) ขั้นตอนต่อเนื่อง (Propagation stage) ขั้นยับยั้ง (Inhibition stage) และขั้นสิ้นสุด (Termination stage) แสดงในสมการที่ 2-9



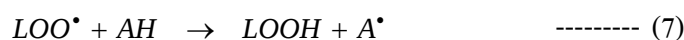
Initiation



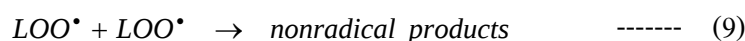
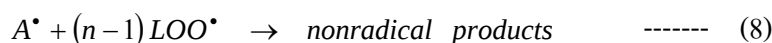
Propagation



Inhibition

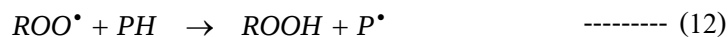


Termination



เมื่อ	R_2N_2	=	สารประกอบอะโซ (azo compound)
	$ROO^\bullet$	=	อนุมูลเพอร์ออกซิล (peroxyl radical)
	LH	=	สารตั้งต้น (substrate)
	AH	=	สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)

วิธีการวิเคราะห์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ORAC และ TRAP จำเป็นต้องใช้สารตัวแทนเพื่อเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา (probes or substrates) โดยสารต้านออกซิเดชันจะแย่งกันทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ในระบบการทดลองจะประกอบด้วย สารกลุ่มอะโซเพื่อผลิตอนุมูลอิสระ (AAPH) probes เพื่อติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สารฟลูออเรสซิน) และสารต้านออกซิเดชัน โดย AAPH จะถูกให้ความร้อนเพื่อสร้างอนุมูลเพอร์ออกซิล เมื่อใส่ฟลูออเรสซิน และสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเกิดการแย่งกันทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกซิล โดยสารต้านออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วเมื่อสารต้านออกซิเดชันทำปฏิกิริยาจนหมดแล้วสารฟลูออเรสซินจึงเข้าทำปฏิกิริยาต่อการเรืองแสง ฟลูออเรสเซนซ์จึงค่อยๆ ลดลง กลไกการแย่งทำปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันและฟลูออเรสซินแสดงในสมการที่ 10-13

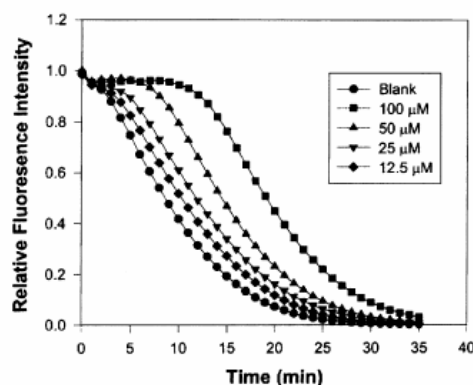


เมื่อ $PH =$ สารตัวแทนสารตั้งต้น (oxidized probes)

1. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay

Prior *et al.* (2003) ศึกษาวิธีการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยหลักการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยเมื่อฟลูออเรสซินทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร็อกไซด์แล้วความเข้มของแสงจะลดลง หากในระบบมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันน้อยจะทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าปริมาณสารต้านออกซิเดชันมากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงช้า เนื่องจากอนุมูลอิสระต้องทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันจนหมดก่อนแล้วจึงทำปฏิกิริยากับฟลูออเรสซิน วิธีนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง และสามารถใช้ได้ทั้งการวัดสมบัติของสารต้านออกซิเดชันในพืชและระบบร่างกาย

วิธี ORAC นี้เป็นการรวมกันระหว่างการหาค่าเวลาในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (inhibition time) และปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ในขณะที่วิธีการอื่นมักหาค่าเวลาในการยับยั้งเมื่อกำหนดปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ หรือหาปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระเมื่อกำหนดระยะเวลา หลักการโดยย่อของวิธี ORAC คือนำตัวอย่าง หรือตัวแทนควบคุม (control) หรือสารมาตรฐาน (standard) ผสมกับสารฟลูออเรสซิน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วเติม AAPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา วัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 485 nm excitation/525 nm emission เป็นเวลา 35 นาทีโดยประมาณ และตั้งอุณหภูมิภายในเครื่องที่ 37 °C โดยในการทดลองใช้สาร Trolox (สารจำลองของวิตามินอี) ความเข้มข้น 4-5 ระดับ เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 7 นำผลที่ได้คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) แล้วคำนวณเป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (net AUC) นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Trolox (Y) (μM) กับพื้นที่ใต้กราฟ (X)



ภาพที่ 7 กราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของสารมาตรฐานTrolox
ที่มา: Huang *et al.* (2005)

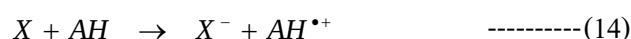
การวัดค่าด้วยวิธี ORAC นี้ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีขึ้นควรใช้ปิเปตชนิดหลายทาง (multichannel) เพื่อใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างลงในไมโครเพลตให้สั้นที่สุด ควบคู่กับเครื่องอ่านค่าพร้อมถาดชนิด 96 หรือ 48 หลุม นอกจากนั้นวิธีนี้ค่อนข้างไวต่ออุณหภูมิ จึงต้องควบคุมทั้งอุณหภูมิภายในเครื่อง และอุณหภูมิของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ให้อยู่ที่ 37 °ซ ก่อนนำมาละลายสาร AAPH สิ่งสำคัญอีกเรื่องหนึ่งคือในการทดลองแต่ละครั้งไม่ควรใช้เวลาเกิน 1 ชั่วโมง เนื่องจากสารหมดประสิทธิภาพ

2. Total Radical Trapping Antioxidant Parameter (TRAP) assay

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้หลักการเดียวกับวิธี ORAC คือใช้สาร AAPH ในการผลิตอนุมูลเพอร์ออกซิล ผลที่ได้เปรียบเทียบกับ Trolox และใช้สารฟลูออเรสซินเป็นสารเรืองแสงเช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกันตรงที่ วิธี ORAC ตรวจสอบความเข้มของแสงที่ลดลงเมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ ในขณะที่วิธี TRAP ตรวจสอบตามปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาโดยดูที่เวลาการเกิดปฏิกิริยาเป็นหลัก ผลที่ได้คำนวณออกมาเป็นค่าไมโครโมลของอนุมูลเพอร์ออกซิลที่ถูกจับไว้ต่อพลาสมา 1 ลิตร แต่วิธีการนี้มีปัญหาเนื่องจากมีจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา (endpoint) หลายจุด ซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนในการทดลองได้

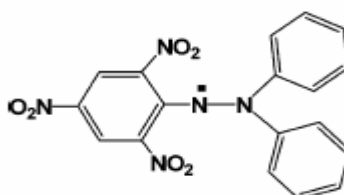
วิธีการที่วัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (based on single electron transfer (SET) reaction)

วิธีการนี้จะวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน ปฏิกิริยานี้จะมีการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน โดยการเปลี่ยนสีจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน คือถ้าสารต้านออกซิเดชันมีความเข้มข้นมากสีของสารละลายก็จะลดลงเร็วขึ้น วิธีการในกลุ่มนี้ ได้แก่ total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay มีกลไกดังแสดงในสมการที่ 14



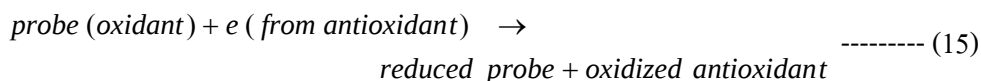
1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay

วิธีนี้จะวัดความสามารถในการยับยั้ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ดังภาพที่ 8 โดย DPPH เป็นสารอนุมูลไนโตรเจนที่ค่อนข้างคงตัว โดยขณะเริ่มต้นการทดลองจะให้สารสีเข้ม เมื่อเกิดปฏิกิริยามากขึ้นสารจะมีสีซีดจางลง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ตามระยะเวลาที่กำหนด หากในระบบมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันมาก สีของสารละลายก็จะลดลงเร็ว กลไกของการเกิดปฏิกิริยาแสดงในสมการที่ 15 ค่าที่ได้สามารถแสดงได้หลายรูปแบบ ได้แก่ แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging activity) ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ร้อยละ 50 จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น (IC₅₀) หรือค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antiradical efficiency, AE)



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH

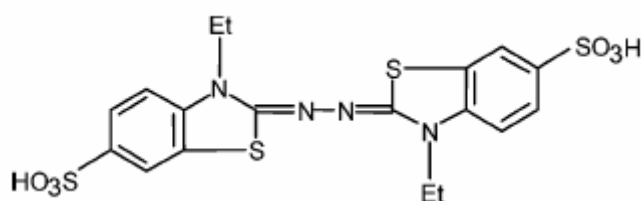
ที่มา: Prior *et al.* (2003)



วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นยำ ใช้เวลาน้อย และใช้เครื่องมือแค่เครื่องวัดการดูดกลืนแสงเท่านั้น เหมาะสำหรับการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันในน้ำผักและน้ำผลไม้ หรือในสารสกัดผักและผลไม้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันในพลาสมา เนื่องจากสาร DPPH ต้องละลายในเมทานอล จึงส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน (Sánchez, 2002) วิธีการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น DPPH TEAC และ FRAP จะมีความสัมพันธ์ดีมาก ($R^2 > 0.99$) กับการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เนื่องจากกลไกในการเกิดปฏิกิริยาเป็นกลไกเดียวกัน (Huang *et al.*, 2005) แต่ในบางกรณีสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมีประสิทธิภาพดี วัดผลได้รวดเร็ว เมื่อวัดด้วยวิธีอื่น อาจให้ผลที่ไม่ดี หรือให้ผลการยับยั้งช้าเมื่อวัดด้วยวิธีนี้ เนื่องจากเป็นวิธีการวัดกลไกที่แตกต่างกัน

2. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay หรือ ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีการวัดความเข้มข้นของ Trolox ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน ต่อ 0.1 มิลลิโมลาร์ของสารตั้งต้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation, $\text{ABTS}^{\cdot+}$) โดยสาร ABTS (2,2-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งในสภาวะปกติจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 342 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นให้ผลิตอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนมาดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร หลักการของวิธีนี้คือวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลเพอร์ออกซิลของ ABTS วัดได้จากการลดลงของสีในสารละลาย

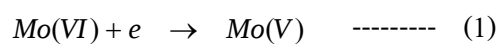


ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS

ที่มา: Prior *et al.* (2005)

3. Total phenols assay

วิธีนี้เป็นการวัดการทำปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับสารฟอลิน-ซีโอเคาท์ วัดการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร (Folin-Ciocalteu Reagent) ในสภาวะที่เป็นเบสโดยการปรับด้วย 7 % โซเดียมคาร์บอเนต (pH ประมาณ 10) โดยที่ความเป็นกรด-เบสประมาณ 10 ฟีนอลิกจะแตกตัวให้โปรตอนกับสารฟอลิน-ซีโอเคาท์ ซึ่งในสารฟอลิน-ซีโอเคาท์จะมีโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ โมลิบดีนัมเป็นสารที่ง่ายต่อการรับอิเล็กตรอน ดังสมการที่ 16 แสดงการเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนระหว่างตัวให้อิเล็กตรอนและ Mo (VI):



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

บัวบกสด (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) ซื้อมาจากตลาดวังหิน จังหวัดกรุงเทพฯ โดยส่วนที่นำไปใช้ในการทดลองคือส่วนที่เป็นใบ และ ก้าน หลังจากนั้นจะนำมาเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. สารเคมี

- 2.1 กรดแกลลิก (Gallic acid; $(\text{HO})_3 \text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$; Analytical grade, Sigma-Aldrich, USA)
- 2.2 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H_2SO_4 ; Analytical grade, Baker Analyzed, USA)
- 2.3 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether; $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$; Analytical grade, Merck, Germany)
- 2.4 โฟลิน-ซีโอคาลเทอ (Folin-Ciocalteu Reagent; Analytical grade, Sigma-Aldrich, USA)
- 2.5 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate; Na_2CO_3 ; Analytical grade, Ajax Finechem, New Zealand)
- 2.6 เฮกเซน (Hexane; CH_3COCH_3 ; Analytical grade, Merck, Germany)
- 2.7 2,2'-ไดฟีนิล-1-ไพคริล-ไฮดราซิด (DPPH; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; Analytical grade Aldrich, Germany)
- 2.8 กรดแอสคอร์บิก (L(+)-Ascorbic acid; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, Polskie Odczynniki, USA)
- 2.9 2,2'-อะซิโน-บิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน-6-ซัลโฟนิก แอซิด); (2,2',-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt): ABTS, Aldrich, Germany)
- 2.10 2,2'-อะโซบิส (2-อะมิโนโพรเพน) ไฮโดรคลอริก; (2,2',-azobis-(2-amidinopropane) HCl: AAPH, Aldrich, Germany)
- 2.11 โพแทสเซียม ได-ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Potassium di-hydrogen Phosphate; KH_2PO_4 ; Analytical grade, Ajax Finechem, New Zealand)
- 2.12 ได-โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Di-Potassium hydrogen Phosphate; K_2HPO_4 ; Ajax Finechem, New Zealand)
- 2.13 อะซิโตน (Acetone; CH_3COCH_3 ; Analytical grade, Merck, Germany)

- 2.14 6-ไฮดรอกซี-2,5,7,8-เตตระเมทิลโครแมน-2-คาร์บอกซีลิก แอซิด; (6-Hydroxy-2,5,7-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox), Sigma-Aldrich, Germany)
- 2.15 ฟลูออเรสซีน (Fluorescein sodium salt; Analytical grade, Sigma-Aldrich, USA)
- 2.16 แทรพโซล แรนคอมลี เมทิลเลทเทด บีตาไซโคลเดกตริน (Trappsol® Randomly Methylated Betacyclodextrin, RMCD: Technical grade, Cyclodextrin Technologies Development Inc., USA)
- 2.17 กรดอะซิติก (Acetic acid; CH_3COOH : Analytical grade, Merck, Germany)
- 2.18 แอนท্রอนรีเอเจนต์ (Anthrone reagent: Sigma-Aldrich, Germany)
- 2.19 เอทานอล (Ethanol; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: Analytical grade, Merck, Germany)
- 2.20 คลอโรฟอร์ม (Chloroform; CHCl_3 : Analytical grade, Lab Scan, Thailand)
- 2.21 เมทานอล (Methanol; CH_3OH : HPLC grade, Mallinckrodt Baker Inc., USA)
- 2.22 กรดมาเดคาสสิก (Madecassic acid mixture of 2 isomers: one of type olean-12-ene and one of type urs-12-ene; $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6$: HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.23 กรดเอเชียติก (Asiatic acid; $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$: HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.24 มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside mixture of 2 isomers: one of type olean-12-ene and one of type urs-12-ene; $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{20}$: HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.25 เอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside; $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{20}$: HPLC grade, Extrasynthese, France)
- 2.26 มอลโตเดกตริน (Maltodextrin; Siam Modified starch, Thailand)
- 2.1 เฮกเซน (Hexane; CH_3COCH_3 : Analytical grade, Merck, Germany)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Super Mocolyo-230, Thermo, Germany)
- 3.2 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Dura-Top, FTS SYSTEMS, USA)
- 3.3 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer: GAE Niro A/S, Denmark)
- 3.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer: Model Spectronic Genesys 10 UV Scanning, Thermo Electron Corporation, USA)
- 3.5 เครื่องบด (Blender: MX-T31GN, National, Japan)
- 3.6 เครื่องเหวี่ยงแยก (Refrigerate centrifuge: Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge, Sorvall, USA)

3.7 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven: Memmert, Schwach ,Germany)

3.8 อ่างน้ำให้ความร้อน (Water bath: Memmert, Model WB 7/14/22/29/45, Schwach ,Germany)

3.9 เครื่องปั่นละเอียด (Homogenizer: IKA-1 3240000s, T10 basic package, IKA, Australia) พร้อมหัวปั่น

3.10 อุปกรณ์สำหรับแยกสารสกัดด้วยเทคนิค High Performance Thin-layer Chromatography ประกอบด้วย แผ่นแก้วโครมาโทกราฟีชนิดผิวเคลือบ (HPTLC Glass Plate, Precoated Silicagel 60 F₂₅₄) เครื่องหยดสาร (Camag Linomat IV) เครื่องสเปรย์ เครื่องให้ความร้อน (Camag TLC Plate Heater III) เครื่องสแกน (Camag TLC Scanner II) พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูป (CATS: Camag, Germany)

3.11 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence spectrophotometer: FLUOstar OPTIMA, BMG, USA)

3.12 ตู้ทำแห้งโดยใช้ลมร้อน (Tray dryer: Reliance tech service, Thailand)

3.13 เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114, Switzerland)

3.14 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker: Scientefic promotion Co, Ltd, USA)

3.15 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (Ultra Sonicator: Branson 22, Germany)

วิธีการ

1. ขอบเขตการทดลอง

การทดลองที่ 1: ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค HPTLC

ตรวจสอบตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) 2 ระบบ คือ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v) และ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9:1 v/v) (Sribusarakum, 1997) ชนิดของ plate (TLC sheet plate และ HPTLC glass plate) ที่เหมาะสมต่อการแยกสารสกัด 80% เมทานอล สารสกัด 80% เมทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเฮกเซน โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (เอเชิติดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดเอเชิติดิก และกรดมาเดลาสสิก และตรวจสอบค่า Retention factor (R_f) (ภาคผนวกที่ ก) ความยาวคลื่นที่มีค่า

การดูดกลืนแสงสูงสุด ของสารละลายมาตรฐานไทรเทอร์ปีนและสารไทรเทอร์ปีนในสารสกัดทั้ง 4 ชนิด สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไทรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค HPTLC (Sribusarakum, 1997)

การทดลองที่ 2: ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบไทรเทอร์ปีนจากบัวบก

สกัดบัวบกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอล 80% เอทานอล น้ำ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และเฮกเซน โดยใช้วิธีสกัดแบบแช่ 24 ชั่วโมง ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Humid *et al.* (2002) ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยนำบักบกทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม เติมตัวทำละลาย 80% เมทานอล 80% เอทานอล น้ำ เฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างแช่ด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 rpm กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายในสารสกัดบัวบกด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย 80% เมทานอล เก็บสารสกัดบัวบกไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารไทรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด (เอเชียติโคไซด์ กรดเอเชียติก มาเดลาสโซไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) ต่อไป

ตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดชนิดต่างๆ โดยใช้การตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอนโดยวิธี Total phenols (Kim and Lee, 2002a) สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Singh *et al.*, 2002) และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (Kim *et al.*, 2002) และสมบัติการให้โปรตอนโดยวิธี ORAC (Prior *et al.*, 2003) ตรวจวัดปริมาณสารประกอบไทรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด ได้แก่ (เอเชียติโคไซด์ กรดเอเชียติก มาเดลาสโซไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) ด้วยเทคนิค HPTLC (Sribusarakum, 1997)

การทดลองที่ 3: ศึกษาผลของวิธีสกัดแบบแช่และวิธีสกัดด้วยเทคนิคปั่นให้ละเอียดต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบไทรเทอร์ปีนจากบัวบก

สกัดบัวบกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอล 80%

เอทานอล และน้ำ ด้วยวิธีสกัดแบบแช่ 24 ชั่วโมง ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Humid *et al.* (2002) ตามวิธีในการทดลองที่ 2 โดยไม่ระเหยตัวทำละลายในสารสกัดบวบก และปรับปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดให้เป็น 50 มิลลิลิตร และวิธีสกัดด้วยเทคนิคปั่นให้ละเอียด ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kim and Lee (2002b) ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยนำบักบกทำแห้งแบบเยือกแข็งบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม ใส่ตัวทำละลาย 80% เมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นละเอียดเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปผสมสารละลายโดยเครื่องสั่นสะเทือนด้วยระบบคลื่นเสียงที่มีความถี่ 35 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก ที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทำการสกัดตัวอย่างบวบก 2 รอบเก็บส่วนใสไว้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตรด้วย 80% เมทานอล (Kim and Lee, 2002a) เก็บสารสกัดบวบกไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด (เอเชิตโคไซด์ กรดเอเชิติก มาเดลาสโซไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) ต่อไป

ตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดชนิดต่างๆ โดยใช้การตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอนโดยวิธี Total phenols (Kim and Lee, 2002a) สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Singh *et al.*, 2002) และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (Kim *et al.*, 2002) และสมบัติการให้โปรตอนโดยวิธี ORAC (Prior *et al.*, 2003) ตรวจวัดปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด ได้แก่ (เอเชิตโคไซด์ กรดเอเชิติก มาเดลาสโซไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) ด้วยเทคนิค HPTLC (Sribusarakum, 1997)

การทดลองที่ 4: ศึกษาผลของการแปรรูปบวบกด้วยวิธีต่างๆ ต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบไตรเทอร์ปีนจากบวบก

แปรรูปบวบกเป็นผลิตภัณฑ์ต่างได้แก่ น้ำบวบก น้ำบวบกผง บวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง บวบกทำแห้งแบบถาด และน้ำชาบวบก เก็บตัวอย่างชนิดต่างๆ ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด (เอเชิตโคไซด์ กรดเอเชิติก มาเดลาสโซไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) ต่อไป

ตรวจวิเคราะห์ความชื้นตามวิธี AOAC (2002) (ภาคผนวก ก) สำหรับตัวอย่างบวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง และตัวอย่างบวบกอบแห้ง สกัดตัวอย่างทั้ง 2 โดยนำบักบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง

และตัวอย่างบัวบกอบแห้งบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม ใส่ตัวทำละลาย 80% เมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิตร จากนั้นปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นละเอียด เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปผสมสารละลายโดยเครื่องสั่นสะเทือนด้วยระบบคลื่นเสียงที่ความถี่ 35 กิโลเฮิร์ต เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยก ที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทำการสกัดตัวอย่างบัวบก 2 รอบเก็บส่วนใสไว้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิตรด้วย 80% เมทานอล (Kim and Lee, 2002a) ซึ่งตัวทำละลายและวิธีการสกัดที่ใช้ได้จากการคัดเลือกจากการทดลองที่ 2 และ 3

ตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดชนิดต่างๆ โดยการใช้การตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอนโดยวิธี Total phenols (Kim and Lee, 2002a) สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Singh *et al.*, 2002) และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (Kim *et al.*, 2002) และสมบัติการให้โปรตอนโดยวิธี ORAC ซึ่งตัวอย่างบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและตัวอย่างบัวบกอบแห้งแบบถาด นำมาสกัดแยกส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนไขมัน (Lipophilic) ตามวิธีสกัดของ Prior *et al.* (2003) สำหรับตัวอย่างน้ำชาบัวบก น้ำบัวบก และบัวบกผงตรวจสอบสมบัติการให้โปรตอนเฉพาะส่วนที่ชอบน้ำ ซึ่งไม่ได้สกัดแยกส่วนที่ชอบไขมัน ตามวิธีสกัดของ Prior *et al.* (2003) ตรวจวัดปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด ได้แก่ (เอเซียติโลไซด์ กรดเอเซียติก มาเคาสโซไซด์ และกรดมาเคาสสิก) ด้วยเทคนิค HPTLC (Sribusarakum, 1997)

1. การเตรียมน้ำบัวบก

เตรียมน้ำบัวบกโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของเชษฐา (2546) โดยนำบัวบกสดจำนวน 75 กรัม ล้างทำความสะอาดแล้ว และเตรียมหั่นแยกเป็นชิ้นๆ จากนั้นนำบัวบกไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า โดยเติมน้ำกรองสะอาด 500 มิลลิตร เมื่อได้บัวบกปั่นละเอียดมาแล้ว ให้นำไปกรองและบีบน้ำออก (ทิ้งกาก) และเติมน้ำอีก 500 มิลลิตร นำน้ำบัวบกที่ได้ไปให้ความร้อนจนได้อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นนำไปกรองแล้วบรรจุขวด แช่น้ำเย็น

2. การเตรียมน้ำบัวบกผง

เตรียมตัวอย่างน้ำบัวบกผงโดยนำน้ำบัวบกปริมาตร 1000 มิลลิตร เติมนอลโตเดกตรินเพื่อปรับค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solid) ประมาณ 10 องศาบริกซ์ ทำแห้งให้เป็นผง

ด้วยเครื่อง Spray dryer โดยกำหนดอุณหภูมิลมร้อนเข้า 180 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิลมร้อนออก 85 องศาเซลเซียส ความดันที่ 1.0 บาร์ ด้วยอัตราการไหล 16 มิลลิลิตรต่อนาที นำตัวอย่างบับกทำแห้งแบบพ่นฝอย บรรจุถุงปิดผนึก

3. การเตรียมบับกทำแห้งแบบเยือกแข็ง

เตรียมตัวอย่างบับกสดจำนวน 1 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาด และหั่นเป็นส่วนๆ นำบับกที่เตรียมไปการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยเครื่อง Freeze dryer นำตัวอย่างบับกทำแห้งแบบเยือกแข็งบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด

4. การเตรียมบับกทำแห้งแบบถาด

เตรียมตัวอย่างบับกสดจำนวน 1 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาด และหั่นเป็นส่วนๆ นำบับกที่เตรียมไปการทำแห้งแบบลมร้อนด้วยตู้ทำแห้งโดยใช้ลม ด้วยอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำตัวอย่างบับกทำแห้งแบบถาดบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด

5. การเตรียมน้ำชาบับก

เตรียมน้ำชาบับกคัดแปลงจากวิธีของ Perva *et al.* (2006) โดยนำตัวอย่างบับกอบแห้งสกัดด้วยน้ำอัตราส่วนบับกอบแห้งต่อน้ำ 2: 40 (w/v) ใส่ลงใน flask นำไปตัวอย่างไปต้มในอ่างน้ำให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองตัวอย่างแล้วบรรจุขวด

2. การตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชัน

2.1 การตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอน (Total Phenols)

ตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอน (Reducing property) โดยวิธี Total Phenols คัดแปลงจากวิธีของ Kim and Lee (2002a) โดยดูดสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟอสโฟรีน-ซีโอเคทู 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 6 นาที เติม 7% โซเดียมคาร์บอเนต 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร วางไว้ในที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที นำมา

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ทำการวัดค่าซ้ำในแต่ละสารสกัด นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกความเข้มข้น 20-100 ppm รายงานสมบัติการให้อิเล็กตรอน เป็น มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก /100 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก /2 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก /100 กรัม ของปริมาณของแข็งทั้งหมด หรือ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก /100 มิลลิลิตรของน้ำบวบก หรือ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก /1000 มิลลิลิตรของน้ำบวบก

2.2 การตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (DPPH Radical Scavenging Capacity)

ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Singh *et al.* (2002) โดยนำสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร (หากต้องเจือจางให้ใช้ เมทานอล) จากนั้นเติมสารละลาย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซีความเข้มข้น 20-100 ppm รายงานสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็น มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/100 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี /2 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี /100 กรัม ของปริมาณของแข็งทั้งหมด หรือ มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี /100 มิลลิลิตรของน้ำบวบก หรือ มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี /1000 มิลลิลิตรของน้ำบวบก

2.3 การตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2'-azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (ABTS Radical Scavenging Capacity)

ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kim *et al.* (2002) โดยนำขวดของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ไปวางในอ่างน้ำให้ความร้อนที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม AAPH 1.0 มิลลิโมลาร์ และ ABTS 2.5 มิลลิโมลาร์ ลงไป ให้ความร้อนอย่างน้อย 20 นาที โดยเขย่าทุก 5 นาที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายอนุมูลอิสระ (radical solution) โดย GHP Acrodisc® 25 mm Syringe Filter with 0.45 μ m GHP membrane เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.650 ± 0.020 นาโนเมตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดผลมตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร และ radical solution 980 ไมโครลิตร และ นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ 734 นาโนเมตรเทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซีความเข้มข้น 20-100 ppm รายงาน สมบัติ การต้านอนุมูลอิสระ ABTS เป็นมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/100 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือมิลลิกรัม สมมูลของวิตามินซี /2 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี /100 กรัมของปริมาณ ของแห้งทั้งหมด หรือมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี /100 มิลลิลิตรของน้ำบวบก หรือมิลลิกรัมสมมูล ของวิตามินซี /1000 มิลลิลิตรของน้ำบวบก

2.4 การตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC (Hydrogen atom transfer (HAT) Reaction): Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC Assay)

ตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันวิธี ORAC โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Prior *et al.* (2003) คือนำตัวอย่างแห้ง 1 กรัมของตัวอย่างบวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง และบวบกอบแห้ง ใส่ในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง เดิมเฮกเซน 10 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วจึงแยกเอาส่วนของเฮกเซนออกมา นำส่วนกากไปสกัดอีกครั้งตั้งแต่ ขึ้นตอนการเติมเฮกเซน แล้วจึงนำส่วนเฮกเซนที่ได้ทั้ง 2 ส่วน มารวมกัน ได้เป็นสารสกัดส่วนที่ 1 คือส่วนไขมัน (Lipophilic) นำส่วนกากที่ได้หลังจากการแยกส่วนเฮกเซนออกแล้วมาระเหยด้วย แก๊สไนโตรเจน (ไนโตรเจนอุตสาหกรรม) ภายในตู้ดูดควันจนแห้ง เติมน้ำตาลละลาย อะซิโตน/น้ำ/ กรดอะซิติก (70/29.5/0.5 v/v/v) 10 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสารละลาย นาน 30 วินาที แล้วนำไปปั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยมีการกลับหลอดตัวอย่างเป็นครั้งคราว ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และมีการกลับหลอด ตัวอย่างเป็นครั้งคราวเช่นกัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกส่วนใสออกมาแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก (70/29.5/0.5 v/v/v) ให้เป็น 25 มิลลิลิตรได้เป็นสารสกัดส่วนที่ 2 คือส่วนน้ำ (Hydrophilic)

2.4.1 การวิเคราะห์สารสกัดส่วนไขมัน (Lipophilic)

นำสารสกัดส่วนที่ 1 คือส่วนไขมัน (Lipophilic) มาระเหยเฮกเซน ด้วยแก๊ส ไนโตรเจนออกจนแห้ง เติมน้ำอะซิโตน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย 7% RMCD (ละลาย RMCD ในสารละลายอะซิโตนเข้มข้น ร้อยละ 50) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าจนตัวอย่างละลายหมด (หากต้องการเจือจางตัวอย่างให้เจือจางด้วย 7% RMCD) นำสารสกัด 20 ไมโครลิตร ใส่ใน well plate เติมน้ำตาลละลายฟลูออเรสซิน 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซินที่อุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาทีแล้ว หลังจากนั้นนำ well plate ไปใส่ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรส

เซนซ์ กำหนดให้ป้อนภายในเครื่องเดิมสารละลาย AAPH ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลุมแล้ว อ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (relative fluorescence intensity) ทันที โดยมีการตั้งค่าความยาวคลื่น excitation ที่ 480 นาโนเมตร และ emission ที่ 520 นาโนเมตร อ่านค่าทุก 180 วินาที (Cycle time)

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัด จากสมการระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับเวลา ดังแสดงในสมการที่ 18 แล้วนำไปลบออกด้วยพื้นที่ใต้กราฟของ 7% RMCD จากนั้นนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ สารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 6.25-50 ไมโครโมลาร์

$$AUC = (0.5 + f_3/f_4 + f_6/f_4 + f_7/f_4 + \dots + f_i/f_4) \times CT \quad \text{-----(18)}$$

เมื่อ AUC = พื้นที่ใต้กราฟ (Area Under Curve)

f_4 = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้นโดยเริ่มอ่านที่รอบที่ 4 (initial fluorescence reading at cycle 4)

f_i = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่ออ่านที่รอบที่ i (fluorescence reading at cycle i)

CT = เวลาที่ใช้ต่อรอบ มีหน่วยเป็นนาที (Cycle time)

2.4.2 การวิเคราะห์สารสกัดส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic)

ปีเปตสารสกัด 20 ไมโครลิตร ใส่ใน well plate เดิมสารละลายฟลูออเรสซิน 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซินที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้ว หลังจากนั้นนำ well plate ไปใส่ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดให้ป้อนภายในเครื่องเดิมสารละลาย AAPH ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลุมแล้วทำการอ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (relative fluorescence intensity) ทันที โดยมีการตั้งค่าความยาวคลื่น excitation ที่ 480 นาโนเมตร และ emission ที่ 520 นาโนเมตร ทำการอ่านค่าทุก 180 วินาที (Cycle time)

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยหาพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัด จากสมการระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับเวลา (สมการที่ 18) แล้วนำไปลบออกด้วยพื้นที่ใต้กราฟของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แล้วจึงนำค่าไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 6.25-50 ไมโครโมลาร์ ค่าที่ได้คำนวณแสดงเป็นปริมาณของ ไมโครโมล Trolox/100 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ ไมโครโมล Trolox /2 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ ไมโครโมล Trolox /100 กรัม ของปริมาณของแข็งทั้งหมด หรือ ไมโครโมล Trolox /100 มิลลิกรัมของน้ำบวบก หรือ ไมโครโมล Trolox /1000 มิลลิกรัมของน้ำบวบก

3. ตรวจวัดปริมาณสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนหลักด้วยเทคนิค HPTLC

ตรวจวัดปริมาณสารไตรเทอร์ปีนชนิดหลัก 4 ชนิด ได้แก่ เอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside) กรดเอเชียติก (Asiatic Acid) มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) และกรดมาเดคาสสิก (Madecassic Acid) โดยเทคนิค HPTLC ซึ่งใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากการแยกสารด้วยเทคนิค Thin layer chromatography ของ Sribusarakum (1997) ระบบประกอบด้วย อุปกรณ์สำหรับแยกสารสกัดด้วยเทคนิค High performance Thin-layer Chromatography ประกอบด้วย แผ่นแก้วโครมาโทกราฟี ชนิดผิวเคลือบ (HPTLC Glass Plate, Precoated Silica gel 60 F₂₅₄) เครื่องหยดสาร (Camag Linomat IV) เครื่องสเปร์ย เครื่องให้ความร้อน (Camag TLC Plate Heater III) เครื่องสแกน (Camag TLC Scanner II) พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูป CATS เตรียมแผ่นแก้วโครมาโทกราฟี ชนิดผิวเคลือบในการแยกสารไตรเทอร์ปีนด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v/v) หยดสารมาตรฐานผสม (เอเชียติโคไซด์ กรดเอเชียติก มาเดคาสโซไซด์ และกรดมาเดคาสสิก) ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทุกตัว 100 ppm ปริมาตร 3-12 ไมโครลิตร และตัวอย่างสารสกัดบวบก ด้วยเครื่องหยดสาร ปล่อยให้แห้ง และนำแผ่น HPTLC plate ใส่ในแท่งแก้วขนาด 20×10 cm ที่มีคลอโรฟอร์ม:เมทานอล:น้ำ (15:7:1 v/v/v) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ เมื่อสารที่หยดเคลื่อนที่ถึงจุดที่กำหนด (8cm) นำแผ่น HPTLC plate มาพักให้แห้ง หลังจากนั้นนำแผ่นสเปร์ยด้วย 0.2 % แอนโธรน รีเอเจนต์ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ให้ความร้อนด้วยเครื่องให้ความร้อน ที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการแสกนความหนาแน่นของสารที่แยกได้ (density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมวลผลที่ได้โดยโปรแกรมสำเร็จรูป CATS รายงานผลเป็นมิลลิกรัมของสารมาตรฐาน/100 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ มิลลิกรัมของสารมาตรฐาน/2 กรัม น้ำหนักแห้ง หรือ มิลลิกรัมของสารมาตรฐาน/100 กรัม ของปริมาณของแข็งทั้งหมด หรือ

มิลลิกรัมของสารมาตรฐาน/100 มิลลิลิตรของน้ำบ๊วบก หรือมิลลิกรัมของสารมาตรฐาน/1000 มิลลิลิตรของน้ำบ๊วบก

4. การประเมินผลทางสถิติ

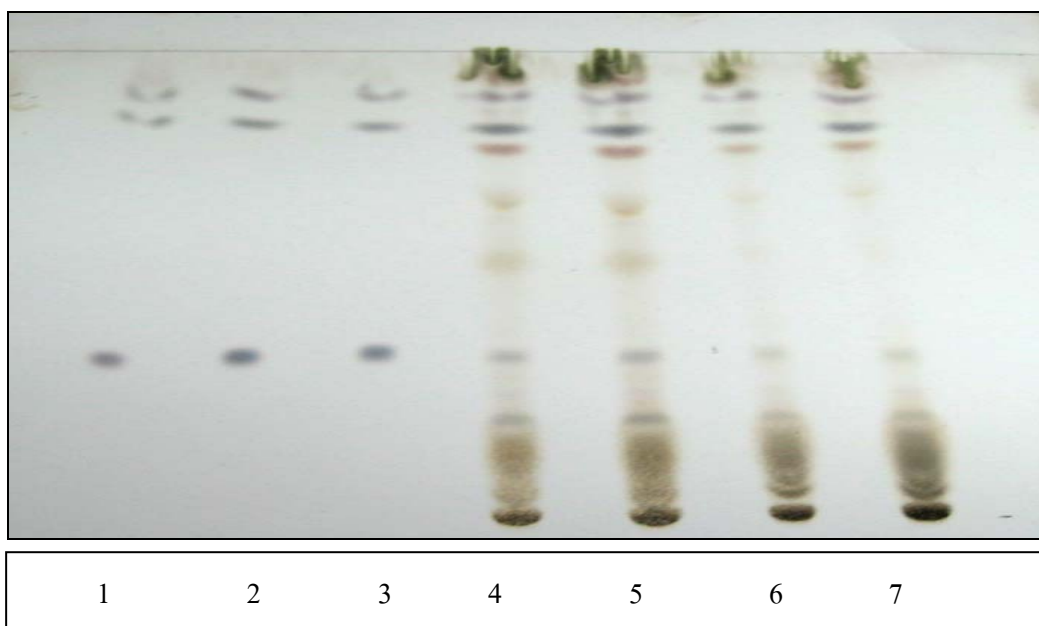
วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) (แบบสุ่มตลอด Complete Randomized Design (CRD)) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD (Least Significant Difference) เปรียบเทียบคู่ด้วยวิธี T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และวิเคราะห์ค่า สหสัมพันธ์ (correlation coefficients) ด้วยวิธี Pearson ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ร้อยละ 99

ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดในสารสกัดบัวบกและสารละลายมาตรฐาน

1.1 ชนิดของ Plate

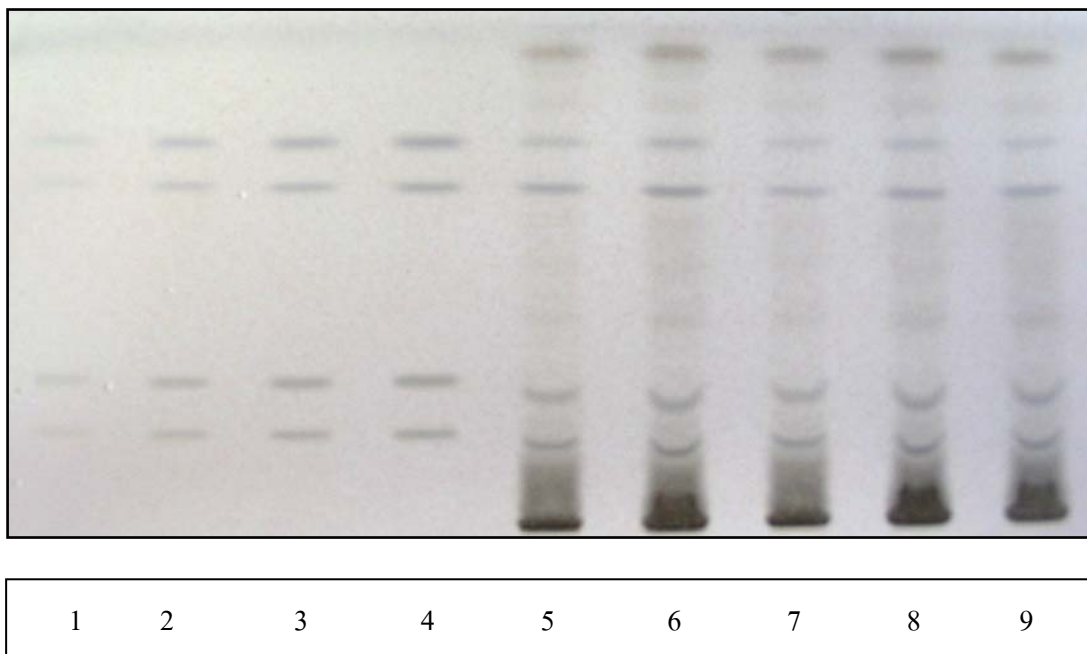
จากการศึกษาชนิดของ TLC Sheet Plate และ HPTLC Glass Plate ต่อการแยกปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลัก พบว่าเมื่อหยดสารละลายมาตรฐานไตรเทอร์ปีนผสม (เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียดิ) สารสกัด 80% เมทานอล และสารสกัด 80% เอทานอล ลงบน TLC Sheet Plate ในระบบเคลื่อนที่คลอโรฟอร์ม:เมทานอล:น้ำ (15:7:1 v/v/v) สามารถแยกและระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนได้ (ภาพที่ 10) แต่ลักษณะของแถบสีสารละลายมาตรฐานไตรเทอร์ปีนผสม และแถบสีสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด หนา และมีการกระจายตัว ทำให้การอ่านค่าความหนาแน่นของแถบสี (density) อาจมีความคลาดเคลื่อนในการวัดปริมาณไตรเทอร์ปีน และเมื่อแยกสารไตรเทอร์ปีนจากสารสกัดเฮกเซน สารสกัดปีโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดน้ำด้วย TLC Sheet Plate พบว่าไม่ปรากฏแถบสีสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการแยกสารไตรเทอร์ปีนด้วย HPTLC Glass Plate เมื่อหยดสารละลายมาตรฐานไตรเทอร์ปีนผสม (มาเดกาสโคไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียดิ) สารสกัด 80% เมทานอล และสารสกัด 80% เอทานอล ลงบน HPTLC Glass Plate ในระบบเคลื่อนที่คลอโรฟอร์ม:เมทานอล:น้ำ (15:7:1 v/v/v) พบว่าปรากฏแถบสีสารไตรเทอร์ปีน และลักษณะแถบสีมีความบางคมชัด ไม่กระจายตัว (ภาพที่ 12 และภาพที่ 13) และเมื่อหยดสารสกัดเฮกเซน สารสกัดปีโตรเลียมอีเทอร์ลงบน HPTLC Glass Plate พบว่าปรากฏแถบสีสารไตรเทอร์ปีน 2 ชนิด และลักษณะแถบสีบาง ไม่กระจายตัว (ภาพที่ 14) จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าการใช้ HPTLC Glass Plate ในการแยกสารสกัดไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบกมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ TLC Sheet Plate ในการแยกและระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนที่มีอยู่ปริมาณน้อยในตัวอย่าง อาจเนื่องจากหลายปัจจัยเช่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคตัวดูดซับ (sorbent) ที่ใหญ่กว่า HPTLC Glass Plate การกระจายตัวของตัวดูดซับมีความหนาแน่นน้อยกว่า HPTLC Glass Plate ทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดซับสารไว้ได้น้อยกว่า จึงไม่เหมาะสมต่อการแยกสารที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่าง (Fried and Sherma, 1986)



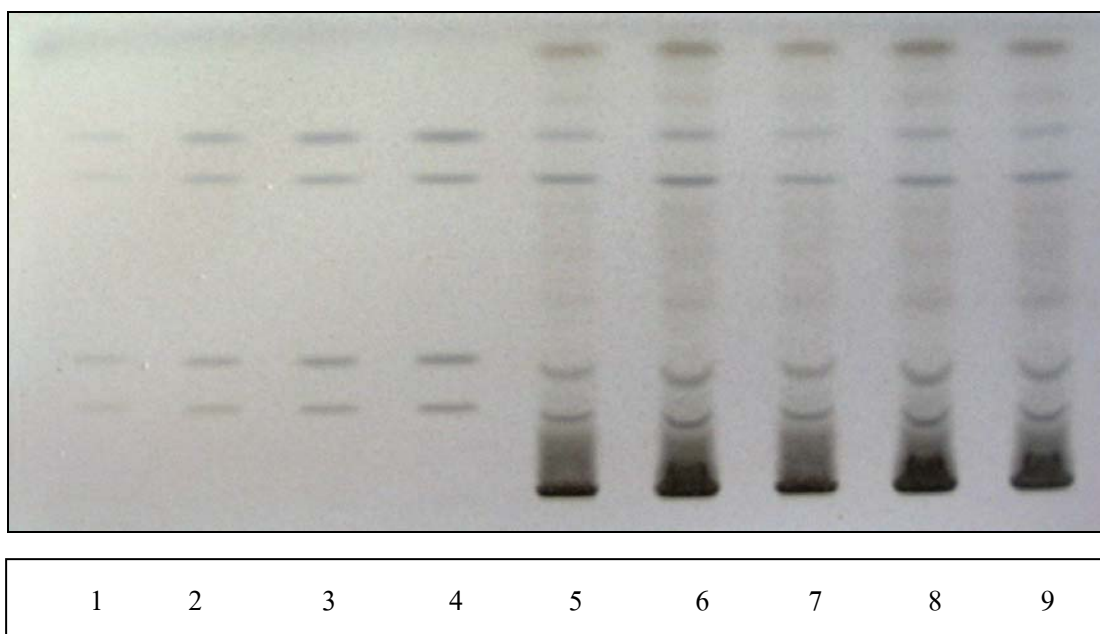
ภาพที่ 10 TLC fingerprints โดยแถวที่ 1-3: สารมาตรฐานผสม (เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียติก) ความเข้มข้น 1000 ppm (20 μ l) แถวที่ 4-5: สารสกัด 80% เมทานอล (20 μ l) แถวที่ 6-7: สารสกัด 80% เอทานอล (20 μ l)



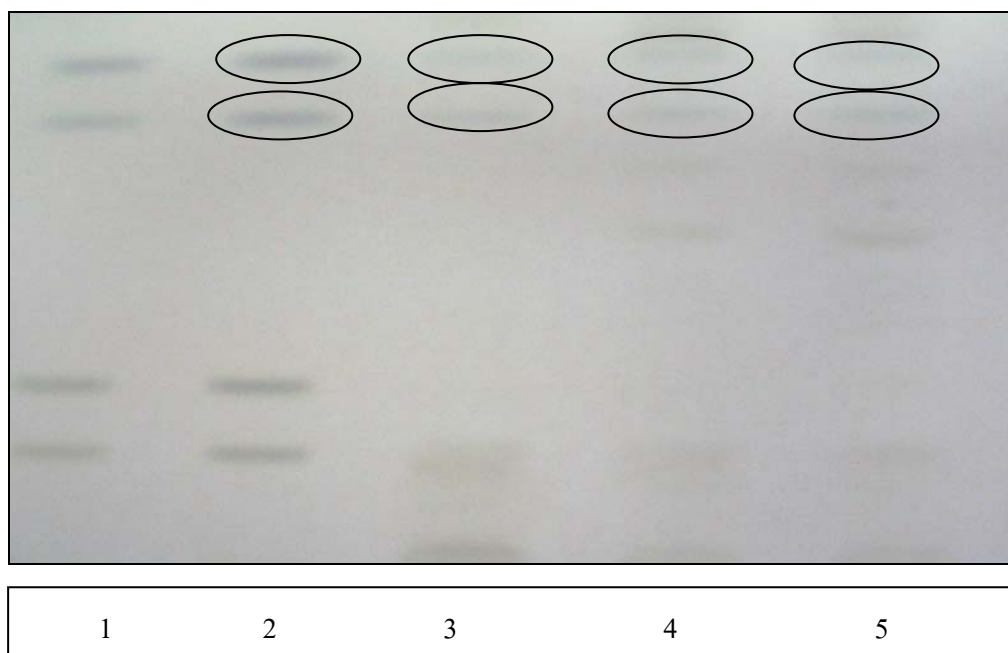
ภาพที่ 11 TLC fingerprints โดยแถวที่ 1-3: สารมาตรฐานผสม (เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียติก) ความเข้มข้น 1000 ppm (20 μ l) แถวที่ 4-5: สารสกัดน้ำ (20 μ l) แถวที่ 6-7: สารสกัด ปีโตรเลียมอีเทอร์ (20 μ l) แถวที่ 8-9: สารสกัดเฮกเซน (20 μ l)



ภาพที่ 12 HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโซไซด์ เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียติก) ความเข้มข้น 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-9: สารสกัด 80% เมทานอล ชั่ว 1-3 (3 μ l)



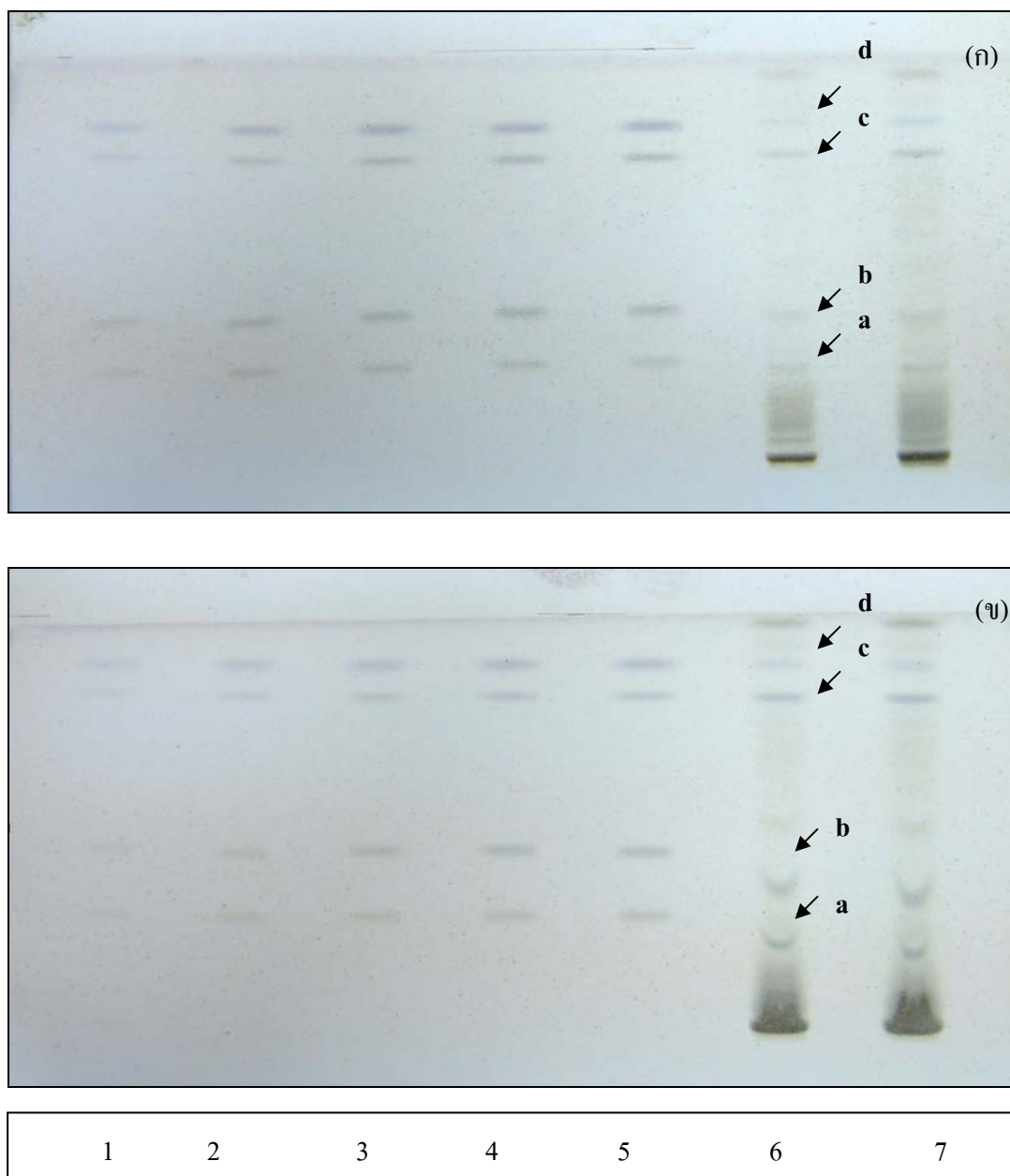
ภาพที่ 13 HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดกาสโซไซด์ เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียติก) ความเข้มข้น 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-9: สารสกัด 80% เอทานอล ชั่ว 1-3 (3 μ l)



ภาพที่ 14 HTLC fingerprints โดยแถวที่ 1-2: สารมาตรฐานผสม (เอเซียติโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเซียติก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (9 และ 12 μ l) แถวที่ 3-4: สารสกัดปีโตรเลียมอีเทอร์ (20 μ l) แถวที่ 5: สารสกัดเฮกเซน (20 μ l)

1.2 ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase)

เมื่อพิจารณาแถบสีสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัด 80% เมทานอลด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v/v) พบว่าแถบสีสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (มาเดลาสโซไซด์ เอเซียติโคไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเซียติก) บาง ตรง และคมชัด ดังแสดงในภาพที่ 15 (ก) แต่เมื่อแยกสารสกัด 80% เมทานอล ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9:1 v/v) พบว่าแถบสีมาเดลาสโซไซด์ (a) และเอเซียติโคไซด์ (b) โค้ง หนา ค่า R_f ของสารไตรเทอร์ปีนเปลี่ยนแปลงไป แต่เมื่อพิจารณาแถบสีสารไตรเทอร์ปีนกรดมาเดลาสติก (c) และกรดเอเซียติก (d) มีความบาง ตรง และคมชัด ดังแสดงในภาพที่ 15 (ข) อาจเนื่องจากมาเดลาสโซไซด์ และเอเซียติโคไซด์ เป็นสารที่มีความเป็นขั้วมากกว่าตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9:1 v/v) ทำให้ละลายได้น้อยประสิทธิภาพการแยกจึงต่ำ โดย Fried and Sherma (1986) กล่าวว่าตัวทำละลายเคลื่อนที่ควรมีความเป็นขั้วใกล้เคียงกับสารที่จะวิเคราะห์เพื่อประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดี



ภาพที่ 15 HTLC fingerprints ของตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ระบบ ภาพ (ก) คลอโรฟอร์ม:

เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v/v) ภาพ (ข) คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9:1 v/v) โดยแถวที่

1-5: สารมาตรฐานผสม (มาเดคาสโซไซด์ (a) เอเซียติโคไซด์ (b) กรดมาเดคาสติก (c)

และกรดเอเซียติก (d)) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9, 12 และ 15 μ l) แถวที่ 6-7:

สารสกัด 80% เมทานอล (1 μ l)

จากผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัด บัวบกและสารละลายมาตรฐานไตรเทอร์ปีนผสมทั้ง 4 ชนิด (เอเชียดิโคไซด์ มาเดกาสโซไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียดิก) จึงเลือกใช้ HPTLC glass plate และตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v/v) เพื่อตรวจสอบปริมาณและระบุชนิดของสาร ไตรเทอร์ปีนในตัวอย่างบัวบก โดยพิจารณาค่า R_f (Retention factor) และความยาวคลื่นที่ดูดกลืน แสงสูงสุดของสารไตรเทอร์ปีนเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

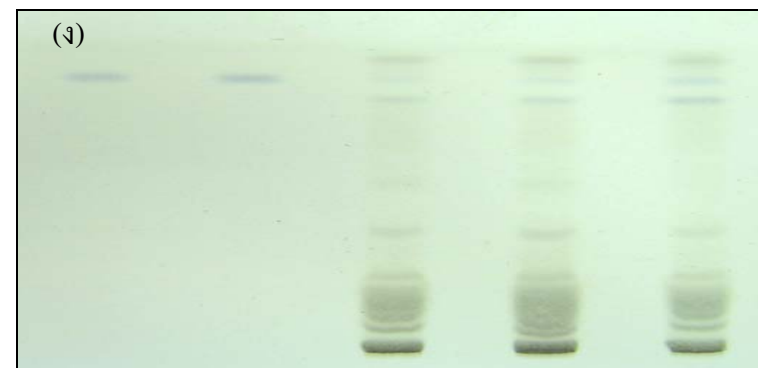
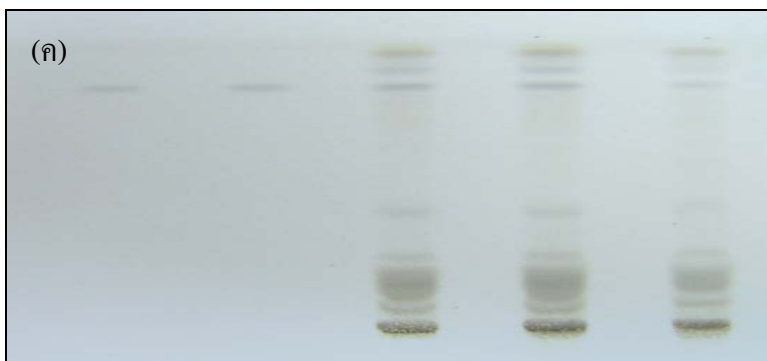
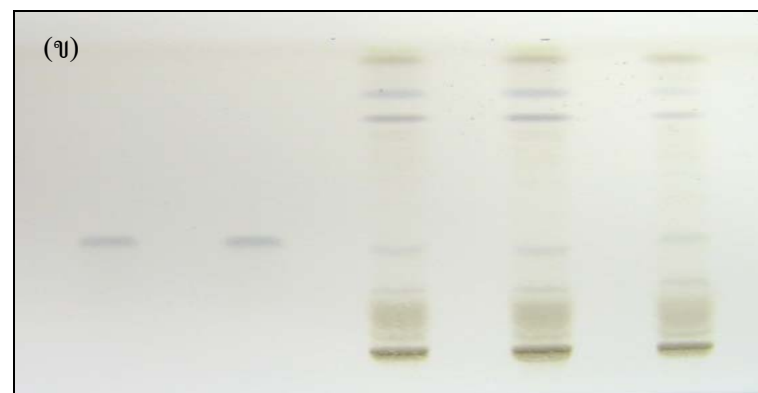
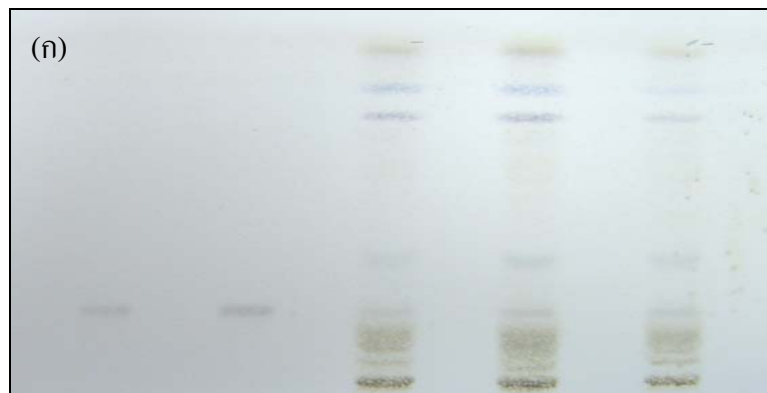
เมื่อพิจารณาค่า R_f (Retention factor) ของสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด (มาเดกาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียดิก) พบว่ากรดเอเชียดิกเคลื่อนที่ บนแผ่น HPTLC glass plate ไกลที่สุด รองลงมา กรดมาเดกาสติก เอเชียดิโคไซด์ และ มาเดกาสโซไซด์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และ ภาพที่ 16 เนื่องจากตัวดูดซับบนแผ่น HPTLC glass plate มีความเป็นขั้ว จึงดูดซับสารไตรเทอร์ปีนอะโกลโคนได้น้อย (กรดมาเดกาสติก และกรดเอเชียดิก) จึงเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารไตรเทอร์ปีนอะโกลโคน (มาเดกาสโซไซด์ และ เอเชียดิโคไซด์) โดยเมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารไตรเทอร์ปีนอะโกลโคน ไม่มีโครงสร้างน้ำตาล เป็นองค์ประกอบ และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า สารไตรเทอร์ปีนอะโกลโคน จึงมีความเป็น ขั้วต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบ R_f ระหว่างกรดเอเชียดิก และกรดมาเดกาสติก พบว่ามีค่าใกล้เคียง กัน เนื่องจากมวลโมเลกุลของสารทั้ง 2 มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4) เช่นเดียวกับ เอเชียดิโคไซด์ และมาเดกาสโซไซด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hengsawas (2004) ใช้ TLC plate ในการแยกสารสกัดไตรเทอร์ปีน (เอเชียดิโคไซด์ มาเดกาสโซไซด์ และ กรดเอเชียดิก) จาก บัวบกผง โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ (15:7:1 v/v/v) ซึ่งพบว่า กรด เอเชียดิก ($R_f=0.75$) เคลื่อนที่บนแผ่น HPTLC glass plate ไกลที่สุดรองลงมา กรดมาเดกาสติก ($R_f=0.70$) เอเชียดิโคไซด์ ($R_f=0.40$) ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ค่า R_f (Retention factor) ของสารไตรเทอร์ปีนมาตรฐานและไตรเทอร์ปีนในสารสกัด
บัวบก

สารไตรเทอร์ปีน	ค่า R_f	น้ำหนักโมเลกุล (M.W.)
มาเดกาสโซไซด์	$0.18 \pm 0.00^*$	974
เอเชียดิโคไซด์	0.32 ± 0.00	958
กรดมาเดกาสสิก	0.73 ± 0.00	504
กรดเอเชียดิก	0.81 ± 0.00	488

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

เมื่อตรวจสอบความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบกและสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (มาเดกาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิก) ซึ่งทำปฏิกิริยากับ spray reagent (0.2% แอนโทรอนรีเอเจนต์ ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น) พบว่ามาเดกาสโซไซด์ และเอเชียดิโคไซด์ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และมีสีเขียวแกมน้ำเงิน สำหรับกรดมาเดกาสสิก และกรดเอเชียดิกมีความยาวคลื่นสูงสุดที่ 588 และ 592 นาโนเมตร ซึ่งมีสีเขียวแกมม่วง ดังตารางที่ 5 และ ภาพที่ 17 โดยการเกิดสีของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดเกิดจากการทำปฏิกิริยากับสารแอนโทรอนรีเอเจนต์ในสภาวะกรด (Sribusarakum, 1997) และที่จากผลการทดลองหาค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุดซึ่งสอดคล้องกับโดย Hiai *et al.* (1976) กล่าวว่า เมื่อสารไตรเทอร์ปีนที่เป็นชนิดอะไกลโคน ทำปฏิกิริยากับสาร anisaldehyde, vanillin และ aromatic aldehydes ในกรดแก่ เช่น กรดซัลฟิวริก ฟอสฟอริกอื่นๆ จะให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดระหว่าง 510 ถึง 620 นาโนเมตร



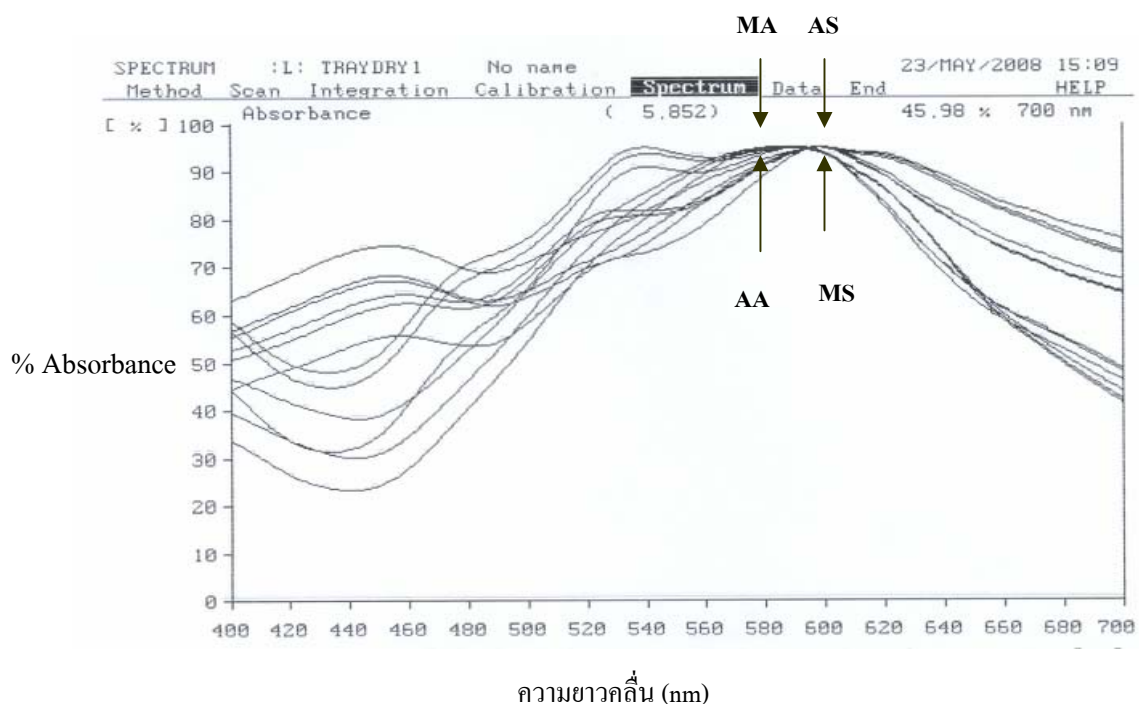
1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

ภาพที่ 16 HTLC fingerprints ระบุชนิดของสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด (เอเชียดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียดิก)
โดยแถวที่ 1-2: สารมาตรฐาน ภาพ (ก) มาเดลาสโซไซด์ ภาพ (ข) เอเชียดิโคไซด์ ภาพ (ค) กรดมาเดลาสสิก ภาพ (ง) กรดเอเชียดิก แถวที่
3-5: สารสกัด 80

ตารางที่ 5 ความยาวคลื่นที่สารไตรเทอร์ปีนดูดกลืนแสงสูงสุด

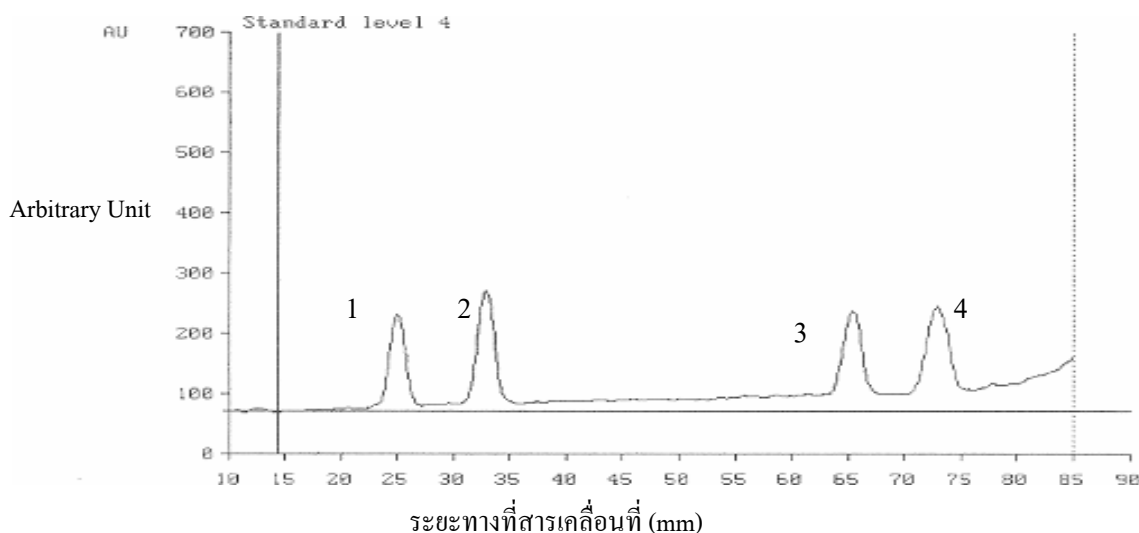
สารไตรเทอร์ปีน	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	สี
มาเดลาสโซไซด์	600	สีเขียวแกมน้ำเงิน
เอเชียดิโคไซด์	600	สีเขียวแกมน้ำเงิน
กรดมาเดลาสสิก	588	สีน้ำเงินแกมม่วง
กรดเอเชียดิก	592	สีน้ำเงินแกมม่วง



ภาพที่ 17 การดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด MA (กรดมาเดลาสสิก) AA (กรดเอเชียดิก) MS (มาเดลาสโซไซด์) AS (เอเชียดิโคไซด์)

สำหรับการทดลองวิเคราะห์ปริมาณไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด ใช้หลักการเปรียบเทียบค่าความเข้มของแสงระหว่างตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว จากการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง scanning densitometer โดยคำนวณจากพื้นที่ของแถบสีระหว่าง

สารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน ดังแสดงตัวอย่างโครมาโตแกรมแสดงพื้นที่ของแถบสีของสารมาตรฐานผสม (เอเชียติโกไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดเอเชียติก และกรดมาเดลาสสิก) ในภาพที่ 18

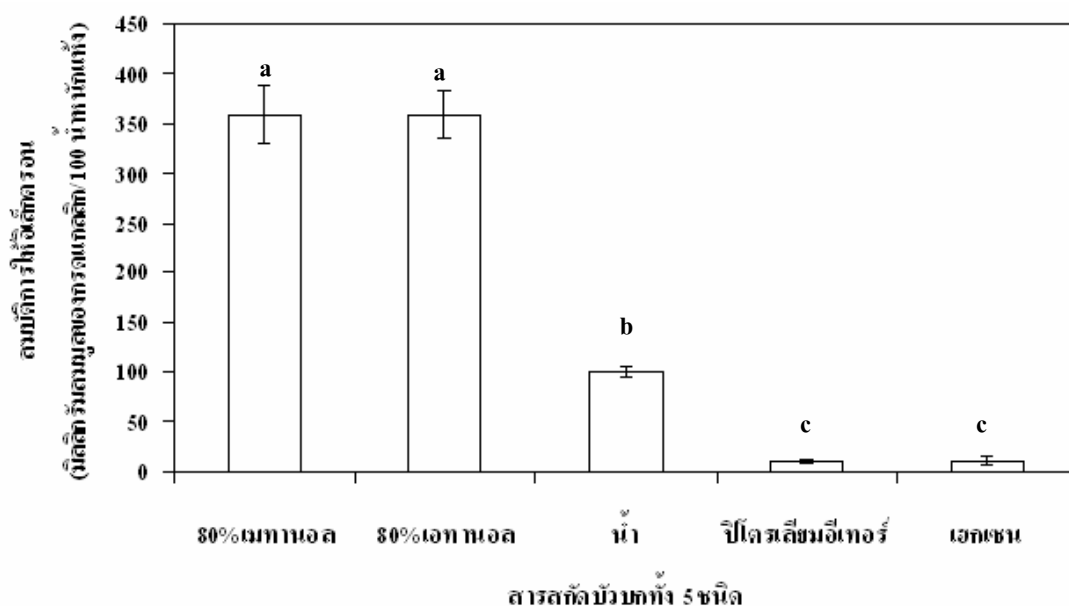


ภาพที่ 18 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสมความเข้มข้น 100 ppm ที่ความยาวคลื่น 600 nm, peak 1: มาเดลาสโซไซด์, peak 2: เอเชียติโกไซด์, peak 3: กรดมาเดลาสสิก, peak 4: กรดเอเชียติก

2. ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารไตรเทอร์ปีน

2.1 สมบัติการต้านออกซิเดชัน

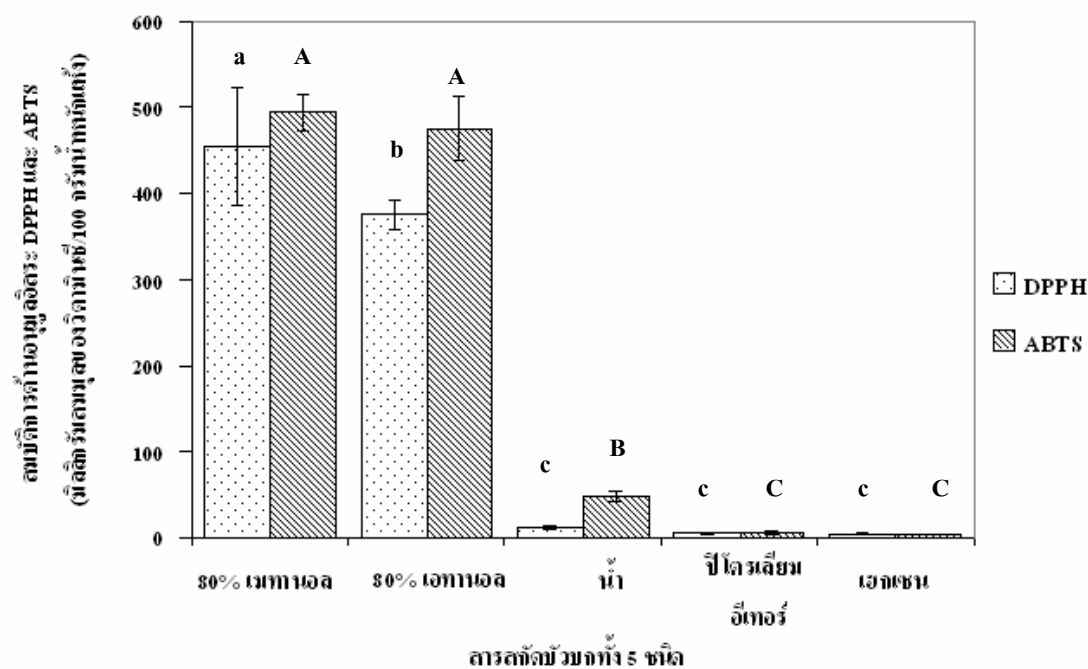
เมื่อตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัด 80% เมทานอล สารสกัด 80% เอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเฮกเซน โดยการวัดสมบัติการให้อิเล็กตรอน (Reducing Property) ด้วยวิธี Total phenols สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และสมบัติการให้โปรตอนด้วยวิธี ORAC พบว่าสารสกัด 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล มีสมบัติการให้อิเล็กตรอนสูงสุด ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือ สารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และ สารสกัดเฮกเซน ตามลำดับ ดังแสดงใน ภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอนของสารสกัดบวบทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี Total phenols
หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างของสมบัติการให้อิเล็กตรอนระหว่างสารสกัดแต่ละชนิด
หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($n=3$)

เมื่อตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ อนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดบวบด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า สารสกัด 80% เมทานอล มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด รองลงมาคือ สารสกัด 80% เอทานอล ส่วนสารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และ สารสกัดเฮกเซน มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด พบว่า สารสกัด 80% เมทานอล และ สารสกัด 80% เอทานอล มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุดรองลงมาคือ สารสกัดน้ำ ส่วนสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และ สารสกัดเฮกเซน มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 20 จากผลการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ อนุมูลอิสระ ABTS มีแนวโน้มไปในทางทิศเดียวกัน เนื่องจากใช้หลักการตรวจสอบประเภทเดียวกันคือ ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Yang *et al.* (2007) ที่ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ของสารสำคัญจากรากบัว (*Nelumbo nuficera* Gaertn) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน และปิโตรเลียมอีเทอร์ พบว่าสารสกัด

เมทานอลแสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอล สารสกัด ไคคลอโรมีเทน สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเอทิลอะซิเตท



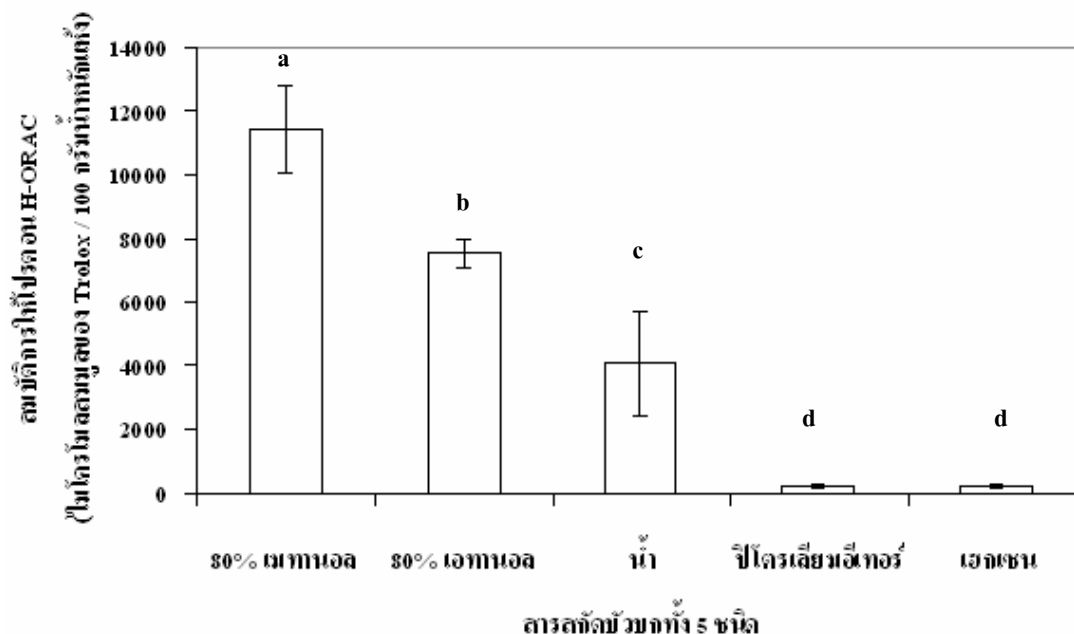
ภาพที่ 20 ตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดบวบทั้ง 5 ชนิด

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างสารสกัด

แต่ละชนิดหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($n=3$)

ตัวอักษร A-C ที่แตกต่างของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ระหว่างสารสกัดแต่ละชนิดหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($n=3$)

เมื่อวิเคราะห์สมบัติการให้โปรตอนด้วยวิธี ORAC พบว่าสารสกัด 80%เมทานอล มีสมบัติการให้โปรตอนส่วนที่เป็นชอบน้ำ ($H-ORAC_{FL}$) สูงสุด รองลงมาคือ สารสกัด 80%เอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเฮกเซน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 21 เนื่องจากสารสกัดบวบทั้ง 5 ชนิดปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอล ซึ่งมีความเป็นขั้วสูง จึงไม่ตรวจสอบสมบัติการให้โปรตอนส่วนไขมัน ($L-ORAC_{FL}$) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานวิจัย Chang *et al.* (1997) พบว่าตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูงมีผลต่อการสกัดสารต้านออกซิเดชันในธรรมชาติโดยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลสามารถสกัดสารที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโรสแมรี่ได้สูงที่สุด



ภาพที่ 21 ตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดยวดยทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี ORAC
หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างของสมบัติการให้โปรตอนระหว่างสารสกัดแต่ละชนิดหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($n=3$)

จากผลการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดยวดยด้วยวิธีต่างๆ มีความสอดคล้องกัน คือสารสกัด 80 % เมทานอลแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงสุด รองลงมาคือสารสกัด 80% เอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์และสารสกัดเอทเธน ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าสารสำคัญในยวดยที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันละลายได้ดีในตัวทำละลาย 80 % เมทานอล โดยมีรายงานวิจัยของ Topcu *et al.* (2007) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของสาร ไตรเทอร์ปีนจากพืชสมุนไพร *Salvia macrochlamys* ด้วยตัวทำละลายเมทานอล แล้วนำมาแยกสาร ไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH วิธีการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ และวิธีอื่นๆ พบว่าสารสกัดไตรเทอร์ปีนด้วยตัวทำละลายเมทานอล แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันใกล้เคียงหรือสูงกว่าสารมาตรฐาน Butylated Hydroxytoluene (BHT)

2.2 ปริมาณสารไตรเทอร์ปีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด คือ กรดเอเชียดิก กรดมาเดลาสสิก เอเชียดิโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ด้วยเทคนิค HPTLC พบว่าสารสกัด 80% เมทานอล และ สารสกัด 80% เอทานอล ตรวจพบสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด คือกรดเอเชียดิก กรดมาเดลาสสิก เอเชียดิโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ (ตารางที่ 6) แต่ไม่พบเอเชียดิโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ในสารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเฮกเซน

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาโครงสร้างของเอเชียดิโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วง มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่มีความเป็นขั้ว และมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (Sribusarakum, 1997) ทำให้สารทั้ง 2 แสดงความเป็นขั้ว จึงละลายได้ดีในตัวทำละลาย 80% เมทานอล และ 80% เอทานอลที่มีความเป็นขั้วสูง แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ และเฮกเซนที่มีความเป็นขั้วต่ำ สำหรับตัวทำละลายน้ำที่มีความเป็นขั้วสูงสุดแต่ไม่ตรวจพบเอเชียดิโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ อาจเนื่องจากเอนไซม์ในบับกไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (มาเดลาสโซไซด์ และเอเชียดิโคไซด์) เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียดิก) (Hostettmann and Marson, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Kawamura *et al.* (1998) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงแบบของสาร momordin II (ไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์) เป็น momordin I (ไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน) ในรากแห้งและรากสดของพืชปะเทงน้ำเต้า (*Momordica cochinchinensis*) เมื่อนำรากมาปั่นให้ละเอียดกับตัวทำละลายน้ำ หรือ เมทานอลผสมน้ำ พบว่าในตัวทำละลายน้ำ 30% เมทานอล และ 60% เมทานอล เอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterases) จะไฮโดรไลซิสเปลี่ยนให้ momordin II เป็น momordin I และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของกรดเอเชียดิก และกรดมาเดลาสสิกประกอบด้วยวงเบนซีน 5 วง มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่มีความเป็นขั้ว ทำให้สารทั้ง 2 แสดงความเป็นขั้วแต่ไม่สูงมากเท่ากับตัวทำละลายน้ำ จึงละลายได้น้อยในตัวทำละลายเฮกเซน ปิโตรเลียมอีเทอร์ และน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลาย 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล ที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าตัวทำละลายเฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์ แต่มีความเป็นขั้วน้อยกว่าตัวทำละลายน้ำ

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสกัด

ตัวอย่างสารสกัด	ปริมาณไตรเทอร์ปีนหลัก 4 ชนิด (มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)			
	เอเชียดิโคไซด์	มาเดกาสโซไซด์	กรดเอเชียดิ	กรดมาเดกาสติก
80% เมทานอล	127.0±6.2 ^a	220.1±11.5 ^a	113.8±17.4 ^a	160.9±9.1 ^a
80% เอทานอล	124.4±3.3 ^a	178.9±10.0 ^b	55.9±11.1 ^b	115.5±9.0 ^b
น้ำ	N/A	N/A	4.2±0.4 ^c	4.5±0.3 ^c
ปิโตรเลียมอีเทอร์	N/A	N/A	2.8±0.2 ^c	3.1±0.3 ^c
เฮกเซน	N/A	N/A	1.8±0.7 ^c	2.1±0.2 ^c

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

(p<0.05) (n=3)

N/A=ไม่สามารถหาได้

เมื่อตรวจสอบปริมาณเอเชียดิโคไซด์และมาเดกาสโซไซด์ในสารสกัดบวบก พบว่าสารสกัด 80% เมทานอลมีปริมาณเอเชียดิโคไซด์ และมีปริมาณมาเดกาสโซไซด์สูงกว่าสารสกัด 80% เอทานอล 3% และ 19 % สำหรับปริมาณกรดเอเชียดิและกรดมาเดกาสติกพบมากสุดในสารสกัด 80% เมทานอลซึ่งมีปริมาณสารทั้ง 2 สูงกว่าในสารสกัด 80% เอทานอล 51% และ 28 % มากกว่าในสารสกัดน้ำ 96% และ 97% มากกว่าในสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ 97% และ 98% และสูงมากกว่าในสารสกัดเฮกเซน 98% และ 99% ซึ่งเมื่อพิจารณาผลรวมของไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียดิโคไซด์ และมาเดกาสโซไซด์) และไตรเทอร์ปีนอะไกลโคโคน (กรดเอเชียดิ และกรดมาเดกาสติก) ของสารสกัด 80 % เมทานอล พบว่ามีปริมาณไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ของสารสกัด 80 % เมทานอล (55.8% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) สูงกว่าไตรเทอร์ปีนอะไกลโคโคน ดังนั้นแสดงว่าสารไตรเทอร์ปีนส่วนใหญ่เป็นสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pramongkit (1995) เมื่อทำบริสุทธิ์สารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียดิโคไซด์ และมาเดกาสโซไซด์) และสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคโคน (กรดเอเชียดิ และกรดมาเดกาสติก) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าปริมาณไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (76.0% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) สูงกว่าสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคโคน (24.0% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sribusarakum (1997) เมื่อทำบริสุทธิ์สารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์

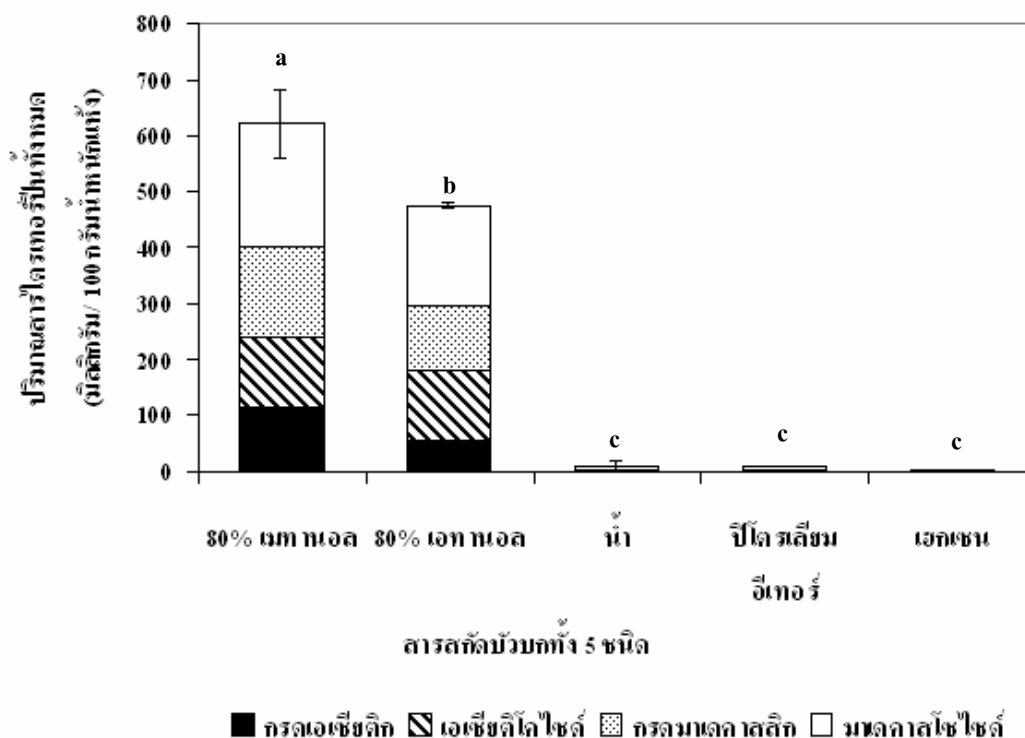
(เอเซียติโคไซด์ และมาเดกาสโซไซด์) และสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดเอเซียติก และกรดมาเดกาสติก) ด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโตกราฟี พบว่าปริมาณไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (79.7% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) สูงกว่าสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (20.3% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) เมื่อพิจารณาสารไตรเทอร์ปีนของบวบจากแหล่งที่มาอื่นพบว่ามีความสอดคล้องกับผลการทดลอง โดย Randriamam *et al.* (2007) ศึกษาสารไตรเทอร์ปีนในบวบจากเกาะมาดากัสการ์ ทั้งหมด 7 พันธุ์ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค HPLC โดยสกัดด้วย 90% เมทานอล พบว่าบวบทั้ง 7 พันธุ์มีปริมาณสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (5.23-12.31% ของ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง) สูงกว่าปริมาณไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (0.16-1.23% ของ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง)

2.3 ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้งหมดในสารสกัดบวบทั้ง 5 ชนิด

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมดหรือ ผลรวมของสารมาเดกาสโซไซด์ เอเซียติโคไซด์ กรดเอเซียติก และกรดมาเดกาสติก ของสารสกัด 80% เมทานอลมีปริมาณรวมไตรเทอร์ปีนสูงสุด (ภาพที่ 22) รองลงมาคือสารสกัด 80 % เอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเฮกเซน ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาสารไตรเทอร์ปีนที่พบมากของสารสกัด 80 % เมทานอล และ 80% เอทานอลคือ มาเดกาสโซไซด์ (35.4% และ 37.7 % ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) รองลงมาคือ กรดมาเดกาสติก (25.9% และ 24.3% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) เอเซียติโคไซด์ (20.4% และ 26.2% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) และกรดเอเซียติก (18.3% และ 11.8% ของไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) ตามลำดับ จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sribusarakum (1997) และ Pramongkit (1995) เมื่อทำการบริสุทธิ์สารไตรเทอร์ปีนจากบวบ (มาเดกาสโซไซด์ เอเซียติโคไซด์ กรดมาเดกาสติก และกรดเอเซียติก) พบว่ามีปริมาณมาเดกาสโซไซด์สูงสุด (42.3% และ 46.9% ของสารไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด)

จากการศึกษาปริมาณสารไตรเทอร์ปีนของสารสกัดทั้ง 5 ชนิดมีแนวโน้มไปในทางทิศเดียวกันกับสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยพบว่าสารสกัด 80% เมทานอลแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงสุด และมีปริมาณรวมสารไตรเทอร์ปีนสูงสุด รองลงมาคือ สารสกัด 80% เอทานอล สารสกัดน้ำ สารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดเฮกเซน ตามลำดับซึ่งอาจเป็นไปได้ที่สารไตรเทอร์ปีนเป็นสารสำคัญในบวบที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชัน



ภาพที่ 22 ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้งหมดของสารสกัดบวบทั้ง 5 ชนิด

หมายเหตุ ตัวอักษร a-c ที่แตกต่างของปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมดระหว่างสารสกัดแต่ละชนิด

หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ($n=3$)

3. ผลของวิธีสกัดแบบแช่และเทคนิคการปั่นให้ละเอียดต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณไตรเทอร์ปีน

3.1 สมบัติการต้านออกซิเดชัน

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัด 80% เมทานอล สารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำจากวิธีสกัดที่ต่างกัน ด้วยการวัดสมบัติการให้อิเล็กตรอนด้วยวิธี Total phenols สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS และสมบัติการให้โปรตอน (H-ORAC) ด้วยวิธี ORAC พบว่าสารสกัด 80% เมทานอล สารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำด้วยการสกัดแบบเทคนิคการปั่นให้ละเอียดแสดงสมบัติการต้านของทุกวิธีที่สูงกว่าการสกัดด้วยวิธีแช่ 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของสมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างตัวอย่างสารสกัดด้วยเทคนิคการปั่น

ให้ละเอียดและการสกัดแบบแช่ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อสกัดด้วยเทคนิคการปั่นให้ละเอียดสารสกัด 80% เมทานอลแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น 14-15% สารสกัด 80% เอทานอลแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น 19-27% และ สารสกัด 80% เอทานอลแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น 26-74% อาจเนื่องจากเทคนิคการปั่นให้ละเอียดช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับตัวทำละลาย และทำให้เซลล์ของพืชแตกออก สามารถสกัดสารสำคัญที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันออกมาได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kursar *et al.* (2005) เปรียบเทียบวิธีการสกัดแบบไฮโมจิไนส์และวิธีแช่ต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารสำคัญที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันในตัวอย่างใบ *Ouratea lucens* และใบ *Acomastylis rossii* พบว่าการสกัดเทคนิคการปั่นให้ละเอียดสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้ดีกว่าวิธีแช่

และเมื่อเปรียบเทียบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัด 80 % เมทานอลสารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำ พบว่าสารสกัด 80 % เมทานอลด้วยวิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียดแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันของทุกวิธีสูงกว่าสารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำ ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัด 80 % เมทานอลด้วยวิธีสกัดแบบแช่ 24 ชั่วโมง แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันของทุกวิธีสูงกว่าสารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำ ตามลำดับซึ่งจากผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองข้อที่ 2 คือ 80 % เมทานอล สามารถสกัดสารสำคัญในบัวบกที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงสุด รองลงมาคือ 80% เอทานอล น้ำ ปีโตรเลียมอีเทอร์และเฮกเซนจากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองที่ 2 คือสารสกัด 80 % เมทานอล สามารถสกัดสารที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด

ตารางที่ 7 สมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด

สมบัติการต้านออกซิเดชัน	สารสกัด	วิธีสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมง	วิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียด
สมบัติการให้อิเล็กตรอน (Total phenols) ¹			
	80% เมทานอล	1783.88±108.21 ^{*b}	2081.46±145.66 ^a
	80% เอทานอล	1437.5±185.57 ^b	1982.11±91.85 ^a
	น้ำ	266.88±40.58 ^b	365.28±130.02 ^a
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ²			
	80% เมทานอล	1619.39±1.92 ^b	1926.01±149.46 ^a
	80% เอทานอล	1346.06±123.35 ^b	1669.39±86.75 ^a
	น้ำ	19.52±0.37 ^b	76.99±23.48 ^a
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ³			
	80% เมทานอล	2593.84±237.51 ^{*b}	3021.61±31.51 ^a
	80% เอทานอล	2184.94±288.30 ^b	2654.94±167.38 ^a
	น้ำ	203.44±26.95 ^b	355.88±64.51 ^a

ตารางที่ 7 (ต่อ) สมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด

สมบัติการต้านออกซิเดชัน	สารสกัด	วิธีสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมง	วิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียด
สมบัติการให้โปรตอน (H-ORAC) ⁴			
	80% เมทานอล	24428.17±2665.337 ^b	28612.91±2851.29 ^a
	80% เอทานอล	19307.58±1774.39 ^b	25572.54±2939.72 ^a
	น้ำ	2132.78±405.81 ^b	5041.15±753.13 ^a

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a–b ที่แตกต่างกันในแนวนอนของสมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างสารสกัดแต่ละชนิดหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

(p≤0.05)

¹มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิก/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

²มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

³มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินอี/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

⁴ไมโครโมลของ Trolox/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

3.2 ปริมาณไทรเทอร์ปีน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไทรเทอร์ปีนของสารสกัด 80% เมทานอล สารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำจากวิธีสกัดที่แตกต่างกันพบว่าสารสกัด 80% เมทานอล สารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำด้วยการสกัดแบบปั่นละเอียดมีปริมาณไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด (เอเชียดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียดิ) สูงกว่าการสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8 แต่ทั้งนี้จากการทดลองไม่พบเอเชียดิโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ในสารสกัดน้ำทั้งวิธีการสกัดแบบปั่นให้ละเอียดหรือการสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมง อาจเนื่องจากเอนไซม์ในบัวบกที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งไฮโดรไลซิสสารไทรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (มาเดลาสโซไซด์ และเอเชียดิโคไซด์) เป็นสารไทรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียดิ) (Hostettmann and Marson, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับ Lester *et al.* (2004) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอสคอร์เบสเปอร์ออกซิเดส คตะเลส ดีไฮโดรแอสคอร์เบสรีดักเตส กลูตาไทโอนรีดักเตส และเอนไซม์อื่นๆ ในผักผลไม้สด และผักผลไม้ที่ผ่านการเยือกแข็ง และการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยการเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยผักผลไม้ที่นำมาทดลองคือใบผักขม แดงไทย จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในผักและผลไม้ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งใกล้เคียงกับเอนไซม์ในผักและผลไม้สด

เมื่อพิจารณาปริมาณสารไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของสารสกัด 80% เมทานอล สารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดน้ำ ด้วยวิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียดและวิธีเขย่า 24 ชั่วโมง พบว่าวิธีการสกัดทั้ง 2 แบบด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอลมีปริมาณสารไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดสูงสุด รองลงมาคือ ตัวทำละลาย 80% เอทานอล และตัวทำละลายน้ำ ตามลำดับซึ่งสารไทรเทอร์ปีนที่พบมากที่สุดของสารสกัด 80% เมทานอลทั้งวิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียดและวิธีแบบเขย่า 24 ชั่วโมงคือ สารมาเดลาสโซไซด์ (41.3% และ 41.5% ของปริมาณสารไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) รองลงมาคือ เอเชียดิโคไซด์ (34.4% และ 34% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) กรดมาเดลาสติก (20.1% และ 17.5% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) และกรดเอเชียดิ (4.2% และ 3% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) ตามลำดับ สำหรับสารสกัด 80% เอทานอลมีปริมาณสารมาเดลาสโซไซด์สูงสุด (44.0% และ 43.2% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) รองลงมาคือ เอเชียดิโคไซด์ (34.0% และ 36.4% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) กรดมาเดลาสติก (20.0% และ 17.8% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) และ กรดเอเชียดิ (2.0% และ 2.6% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) ตามลำดับ และในตัวอย่างสารสกัดน้ำ มีปริมาณมาเดลาสติกสูงสุด (66.6% และ 78.07% ของไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) รองลงมาคือกรด

เอเซียติก (33.4% และ 21.93% ของไตรเทอร์ปีนทั้งหมด) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Sribusarakum (1997) และ Pramongkit (1995) เมื่อทำการบริสุทธิ์สารไตรเทอร์ปีนจากบัวบกพบว่า มีปริมาณมาเดกาสโซไซด์สูงสุด (46.9% และ 42.3% ของปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้งหมด) เอเซียติโคไซด์ (32.8% และ 33.8%) กรดมาเดกาสสิก (10.9% และ 12.7%) และกรดเอเซียติก (9.4% และ 11.3%) ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับผลการทดลองจากการทดลองที่ 2 คือ 80 % เมทานอล สามารถสกัดสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดในบัวบกได้สูงสุด รองลงมาคือ 80% เอทานอล และน้ำ ตามลำดับ แต่อัตราส่วนการกระจายตัวของสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดแตกต่างกันคือ การทดลองที่ 2 ในตัวอย่างสารสกัด 80% เมทานอลมีปริมาณกรดมาเดกาสสิกสูงกว่าเอเซียติโคไซด์ และในตัวอย่างสารสกัด 80% เมทานอล และสารสกัด 80% เอทานอลมีการกระจายตัวของกรดเอเซียติกที่สูงกว่า (18.3% และ 12.2% ของไตรเทอร์ปีนทั้งหมด) อาจเนื่องจากวัตถุดิบเริ่มต้นที่นำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ในการทดลองที่ 2 และการทดลองที่ 3 ไม่ได้ใช้วัตถุดิบเริ่มต้นเดียวกัน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ตรวจวัดปริมาณไตรเทอร์ปีนได้แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของโดย Randriamam *et al.* (2007) ศึกษาสารไตรเทอร์ปีนในบัวบกจากเกาะมาดากัสการ์ ทั้งหมด 7 พันธุ์ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค HPLC โดยสกัดด้วย 90% เมทานอล พบว่าบัวบกทั้ง 7 พันธุ์มีปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดแตกต่างกัน

ตารางที่ 8 ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด

สารไตรเทอร์ปีน	สารสกัด	วิธีสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมง	วิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียด
เอเชิขติโคไซด์	80% เมทานอล	247.45±8.32 ^{*b}	318.97±2.25 ^a
	80% เอทานอล	207.75±19.15 ^b	252.94±6.68 ^a
	น้ำ	N/A	N/A
กรดเอเชิขติก	80% เมทานอล	21.56±2.16 ^b	38.89±5.82 ^a
	80% เอทานอล	14.54±2.39 ^b	22.96±2.35 ^a
	น้ำ	3.55±0.58 ^b	6.05±1.89 ^a
มาเดคาสโซไซด์	80% เมทานอล	301.81±2.71 ^b	383.12±1.20 ^a
	80% เอทานอล	246.18±15.77 ^b	327.27±13.51 ^a
	น้ำ	N/A	N/A

ตารางที่ 8 (ต่อ) ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมงและวิธีการปั่นให้ละเอียด

สารไตรเทอร์ปีน	สารสกัด	วิธีสกัดแบบเขย่า 24 ชั่วโมง	วิธีสกัดแบบปั่นให้ละเอียด
กรดมาเคลาสสิก	80% เมทานอล	127.61±5.24 ^{*b}	187.15±11.18 ^a
	80% เอทานอล	102.03±5.15 ^b	150.03±3.96 ^a
	น้ำ	7.08±2.82 ^b	21.55±2.28 ^a
ไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด	80% เมทานอล	720.85±12.99 ^b	928.13±6.58 ^a
	80% เอทานอล	570.51±39.67 ^b	744.94±16.34 ^a
	น้ำ	10.63±3.43 ^b	27.60±4.14 ^a

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างกันในแนวนอนของปริมาณไตรเทอร์ปีนระหว่างสารสกัดแต่ละชนิดหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

N/A=ไม่สามารถหาได้

4. ผลของการแปรรูปต่อสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณไตรเทอร์ปีน

ตัวอย่างบัวบกสดมีความชื้น 90.2% เมื่อนำตัวอย่างบัวบกแปรรูปด้วยการทำแห้งแบบต่างๆ พบว่าบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งมีความชื้น 7.5% และบัวบกทำแห้งแบบถาดมีความชื้น 5.0% สำหรับตัวอย่างน้ำบัวบกผงมีความชื้น 4.4%

จากการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยการวัดสมบัติการให้อิเล็กตรอนโดย Total phenols สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS และการวัดสมบัติการให้โปรตอนของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบไขมันด้วยวิธี ORAC พบว่าบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันทุกวิธียกเว้นสมบัติการให้โปรตอนของส่วนที่ชอบไขมันสูงกว่าบัวบกทำแห้งแบบถาดอยู่ในช่วง 26.5-50.8% ดังแสดงในตารางที่ 9 จากผลการทดลองพบว่าการให้ความร้อนบัวบกทำแห้งแบบถาดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงมีผลทำให้สารสำคัญในบัวบกที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันเสื่อมสลายซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Toor and Savage (2006) ศึกษาผลของการอบแห้งมะเขือเทศ 3 พันธุ์ด้วยอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมงต่อสารสำคัญและสมบัติการต้านออกซิเดชัน พบว่าเมื่อตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS และ Total phenols ของมะเขือเทศอบแห้งทั้ง 3 พันธุ์มีสมบัติการต้านออกซิเดชันลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสดและแบบเยือกแข็ง

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติการให้โปรตอนในส่วนที่ชอบน้ำและส่วนไขมันด้วยวิธี ORAC พบว่าสารสำคัญในส่วนที่ชอบน้ำของบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบัวบกทำแห้งแบบถาดแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันมากกว่า 97% และ 93% ของสมบัติการต้านออกซิเดชันทั้งหมด นอกจากนี้สารสำคัญในส่วนที่ชอบไขมันของบัวบกทำแห้งแบบถาดแสดงสมบัติการให้โปรตอนที่ใกล้เคียงกับบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง อาจเนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่ในบัวบกที่แสดงสมบัติการให้โปรตอนเป็นสารในส่วนที่ชอบน้ำ จึงไม่พบความแตกต่างของสมบัติการให้โปรตอนของส่วนไขมัน โดยเมื่อพิจารณาสารสำคัญในบัวบกส่วนใหญ่เป็นสารที่มีความเป็นขี้ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Prum *et al.*, 1983) และสารไตรเทอร์ปีนซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) และน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง (Inamdar *et al.*, 1996)

ตารางที่ 9 สมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างบวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบวบกทำแห้งแบบ
ถาด

สมบัติการต้านออกซิเดชัน	บวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง	บวบกทำแห้งแบบถาด
สมบัติการให้อิเล็กตรอน ² (Total Phenols Assay)	2250.66±157.47* ^a	1243.9±8.1 ^b
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ³	2082.22±167.57 ^a	1222.4±26.4 ^b
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁴	3266.61±34.06 ^a	1608.5±67.0 ^b
สมบัติการให้โปรตอน ⁵ (H-ORAC)	14944.6±1220.3 ^a	10616.4±815.2 ^b
สมบัติการให้โปรตอน (L-ORAC)	442.1±57.7 ^a	414.5±89.5 ^a
สมบัติการให้โปรตอน (TAC) ¹	15386.7±1215.4 ^a	11317.7±766.5 ^b

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างในแนวนอนของสมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างตัวอย่าง
หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

(TAC)¹ หมายถึง สมบัติการต้านออกซิเดชันทั้งหมด (ผลรวมของ H-ORAC และ L-ORAC)

²มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/ 100 กรัม น้ำหนักของแข็งทั้งหมด

³มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/ 100 กรัม น้ำหนักของแข็งทั้งหมด

⁴มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/ 100 กรัม น้ำหนักของแข็งทั้งหมด

⁵ไมโคร โมลของ Trolox/ 100 กรัม น้ำหนักของแข็งทั้งหมด

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด คือ กรดเอเชียติก กรดมาเดลาสสิก เอเชียติโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ด้วยเทคนิค HPTLC ของบั่วบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบั่วบกอบแห้งแบบแดด พบว่าปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 3 ชนิด (มาเดลาสโซไซด์ เอเชียติโคไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) ในตัวอย่างบั่วบกอบแห้งแบบแดดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ทั้งนี้พบปริมาณกรดเอเชียติกมากกว่าบั่วบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตารางที่ 10) ทั้งนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างบั่วบกอบแห้งแบบแดดให้ความร้อน 55 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมงเกิดไฮโดรไลซิสเอเชียติโคไซด์เป็นกรดเอเชียติกซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ He *et al.* (2006) ศึกษาสารไตรเทอร์ปีนในผลิตภัณฑ์ Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเมื่อให้ความร้อนสารสกัด ของ Black cohosh 90 องศาเซลเซียสระยะเวลา 3 ชั่วโมง สารไตรเทอร์ปีนลดลง และเกิดการเปลี่ยนรูปจากสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน ซึ่งสารไตรเทอร์ปีนในบั่วบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบั่วบกทำแห้งแบบแดดที่พบมากที่สุดคือ มาเดลาสโซไซด์ (41.3% และ 28.4% ของปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) เอเชียติโคไซด์ (34.4% และ 27.0%) กรดมาเดลาสสิก (20.1% และ 24.0%) และกรดเอเชียติก (4.2% และ 20.6%) ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของบั่วบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบั่วบกทำแห้งแบบแดด

ไตรเทอร์ปีน	บั่วบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง	บั่วบกทำแห้งแบบแดด
	(มิลลิกรัม/ 100 กรัมปริมาณน้ำหนักของแห้งทั้งหมด)	
กรดเอเชียติก	42.04±6.29 ^a	126.2±3.5 ^a
กรดมาเดลาสสิก	202.32±12.08 ^a	147.4±20.2 ^b
เอเชียติโคไซด์	344.84±2.44 ^a	166.2±45.8 ^b
มาเดลาสโซไซด์	414.18±1.30 ^a	174.0±1.1 ^b
ปริมาณไตรเทอร์ปีนรวม	1084.73±7.69 ^a	613.7±67.0 ^b

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างในแนวนอนของสารไตรเทอร์ปีนระหว่างตัวอย่างหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆระหว่างน้ำชาบัวบกและบัวบกทำแห้งแบบตากโดยเตรียมตัวอย่างน้ำชา จากบัวบกทำแห้งแบบตาก 2 กรัมต่อน้ำ 40 มิลลิลิตรพบว่า สมบัติการต้านออกซิเดชันบัวบกทำแห้งแบบตากสูงกว่าน้ำชาบัวบกอยู่ในช่วง 27.3-73.4% (ตารางที่ 11) สำหรับตัวอย่างน้ำชาบัวบกไม่ได้วัดค่าส่วนที่ขบไขมัน เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีน้ำเป็นตัวทำละลายในการแปรรูป ซึ่งส่วนที่ขบไขมัน มีความเป็นขี้ดต่ำอาจไม่ละลายมากับตัวทำละลายน้ำที่มีความเป็นขี้ดสูง Wu *et al.* (2004) กล่าวว่าตัวอย่างที่เป็นน้ำ หรือของเหลวหนืดเช่นน้ำส้มโอ น้ำมะนาว เป็นต้น มีความเป็นขี้ดสูง จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ตัวทำละลายเฮกเซนในการแยกส่วนที่ขบไขมัน เพราะส่วนที่ขบไขมัน มีความเป็นขี้ดต่ำไม่ละลายมากับตัวทำละลายน้ำที่มีความเป็นขี้ดสูง

จากผลการทดลองเมื่อให้ความร้อนน้ำชาบัวบก 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที มีผลทำให้สารสำคัญที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันเสื่อมสลาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ กับ รายงานวิจัยของกัลยา และคณะ (2550) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำสกัดจากสมุนไพรทำแห้ง 4 ชนิด คือ หญ้าคา (*Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv.) หญ้าปังกิ่ง (*Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy) หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) และหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon aristatus* Miq.) ด้วยวิธี DPPH และ วิธี Total phenols ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ (70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส) และเวลาการสกัด 3 ระดับ (30 45 และ 60 นาที) จากการหาสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และวิธี Total phenols พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดสูงขึ้นจะส่งผลให้สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำสกัดจากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดลดลง

ตารางที่ 11 สมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำชาบัวบกและบัวบกทำแห้งแบบถาด

สมบัติการต้านออกซิเดชัน	น้ำชาบัวบก	บัวบกทำแห้งแบบถาด
สมบัติการให้อิเล็กตรอน ¹ (Total Phenols Assay)	17.4±0.7* ^b	23.6±0.2 ^a
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระDPPH ²	16.4±0.4 ^b	23.2±0.5 ^a
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ³	25.9±10 ^b	30.6 ±1.3 ^a
สมบัติการให้โปรตอน ⁴ (H-ORAC)	53.8±5.7 ^b	201.7±15.5 ^a

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างในแนวนอนของสมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างตัวอย่าง

หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

¹มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/2 กรัม น้ำหนักแห้ง

²มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/2 กรัม น้ำหนักแห้ง

³มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/2 กรัม น้ำหนักแห้ง

⁴ไมโครโมลสมมูลของ Trolox/2 กรัม น้ำหนักแห้ง

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไทรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด ของบัวบกทำแห้งแบบถาดและน้ำชาบัวบก พบว่าปริมาณไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด (มาเดกาสโโซไซด์ เอเซียติโคไซด์ กรดเอเซียติก และกรดมาเดกาสติก) ของน้ำชาบัวบกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งแสดงว่าการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที มีผลต่อสารไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดเสื่อมสลาย นอกจากนี้พบว่าบัวบกทำแห้งแบบถาดและน้ำชาบัวบกมีปริมาณมาเดกาสโโซไซด์สูงสุด (28.4% และ 49.8% ของปริมาณสารไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) รองลงมาคือเอเซียติโคไซด์ (27.0% และ 40.4%) กรดมาเดกาสติก (24.0% และ 5.3%) และกรดเอเซียติก (20.6% และ 3.5%) ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ปริมาณไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของบัวบกอบแห้งแบบถาดและน้ำชาบัวบก

ไทรเทอร์ปีน	บัวบกทำแห้งแบบถาด	น้ำชาบัวบก
กรดเอเชียติก	2.4±1.2 ^a	0.2±0.007 ^b
กรดมาเดลาสติก	2.8±1.4 ^a	0.3±0.04 ^b
เอเชียติโคไซด์	3.2±0.7 ^a	2.3±0.1 ^b
มาเดลาสโซไซด์	3.3±0.02 ^a	2.8±0.1 ^b
ปริมาณไทรเทอร์ปีนรวม	11.7±1.3 ^a	5.7±0.06 ^b

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างในแนวนอนของสารไทรเทอร์ปีนระหว่างตัวอย่างหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆระหว่างน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผง ซึ่งเปรียบเทียบโดยใช้น้ำ 1000 มิลลิลิตรพบว่าน้ำบัวบกผงแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำบัวบกของทุกวิธีโดยอยู่ในช่วง 4.2-61.3% (ตารางที่ 13) โดยไม่ได้วัดค่าส่วนไขมันในตัวอย่างน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผงด้วยวิธี ORAC เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีน้ำเป็นตัวทำละลายในการแปรรูป ซึ่งส่วนที่ขอบไขมัน มีความเป็นขี้ด้าอาจไม่ละลายมากับตัวทำละลายน้ำที่มีความเป็นขี้ด้าสูง

จากผลการทดลองพบว่าน้ำบัวบกผงซึ่งผ่านการให้ความร้อนสูงกว่าด้วยอุณหภูมิความร้อนเข้า 180 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิความร้อนออก 80 องศาเซลเซียส แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำบัวบกที่ให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที อาจเนื่องจากอิทธิพลเสริมฤทธิ์กันของสารมอลโตเด็คตรินซึ่งผสมในน้ำบัวบกก่อนนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย และสารสำคัญในน้ำบัวบก ซึ่งมอลโตเด็คตรินเป็นสารถัดแปดจากมันสำปะหลัง มีสมบัติการต้านออกซิเดชัน ดังรายงานของ Isamah *et al.* (2003) ศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Thiobarbituric Acid (TBA) ของหัวมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) หลังการเก็บเกี่ยวพบว่าในสารสกัดหัวมันสำปะหลังแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชัน หรืออีกสาเหตุหนึ่ง คือ เกิดผลิตภัณฑ์ non- enzymatic browning ระหว่างกระบวนการให้ความร้อน ซึ่งมีรายงานวิจัยของ

Choi และคณะปี 2006 พบว่าเมื่อนำเห็ดไปผ่านการให้ความร้อนระดับสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที พบว่าคุณสมบัติด้านออกซิเดชันสูงกว่าตัวอย่างเห็ดที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เนื่องจากในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนจะเกิดผลิตภัณฑ์จาก non- enzymatic browning หรือปฏิกิริยาเมลลาร์ดส่งผลต่อการเกิด chainbreaking และ oxygen scavenging activities ทำให้แสดงคุณสมบัติด้านออกซิเดชันสูงขึ้น (Manzocco และคณะ, 2001)

ตารางที่ 13 สมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผง

สมบัติการต้านออกซิเดชัน	น้ำบัวบก	น้ำบัวบกผง
สมบัติการให้อิเล็กตรอน (Total Phenols Assay) ¹	61.1±4.0 ^{*b}	71.2±1.3 ^a
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ²	20.0±2.0 ^b	26.5±3.9 ^a
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ³	50.8±2.9 ^b	60.9 ±4.8 ^a
สมบัติการให้โปรตอน (H-ORAC) ⁴	189.5±20.2 ^b	489.6±51.5 ^a

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างในแนวนอนของสมบัติการต้านออกซิเดชันระหว่างตัวอย่าง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

¹มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/1,000 มิลลิลิตรของน้ำบัวบก

²มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/1,000 มิลลิลิตรของน้ำบัวบก

³มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี/1,000 มิลลิลิตรของน้ำบัวบก

⁴ไมโครโมลของ Trolox/1,000 มิลลิลิตรของน้ำบัวบก

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไทรเทอร์ปีนในน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผง พบว่าน้ำบัวบกผงมีปริมาณกรดเอเชียติกและกรดมาเดลาสติก น้อยกว่าน้ำบัวบกผงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 14 แสดงว่าการให้ความร้อนสูงที่อุณหภูมิความร้อนเข้า 180 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิร้อนออก 80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้สารทั้ง 2 เสื่อมสลาย นอกจากนี้ในทั้งตัวอย่างน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผงไม่พบมาเดลาสโซไซไซด์และเอเชียติโคไซด์ อาจเนื่องจากเอนไซม์ในบัวบกสลายไฮโดรไลซิสสารไทรเทอร์ปีนไกลโคไซด์(มาเดลาสโซไซไซด์ และเอเชียติโคไซด์) เป็นไทรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดมาเดลาสติก และกรดเอเชียติก) (Hostettmann and Marson, 1995) โดยแสดงผลของเอนไซม์ต่อการไฮโดรไลซิสสารไทรเทอร์ปีนดังภาพที่ 23

ตารางที่ 14 ปริมาณไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผง

ไทรเทอร์ปีน	น้ำบัวบก	น้ำบัวบกผง
	(มิลลิกรัม/ 1000 มิลลิลิตรของน้ำบัวบก)	
กรดเอเชียติก	5.6±0.9 ^a	1.6±2.3 ^b
กรดมาเดลาสติก	12.5±1.6 ^a	9.0±2.5 ^b
เอเชียติโคไซด์	N/A	N/A
มาเดลาสโซไซด์	N/A	N/A
ปริมาณไทรเทอร์ปีนรวม	18.1±1.4 ^a	10.6±2.5 ^b

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

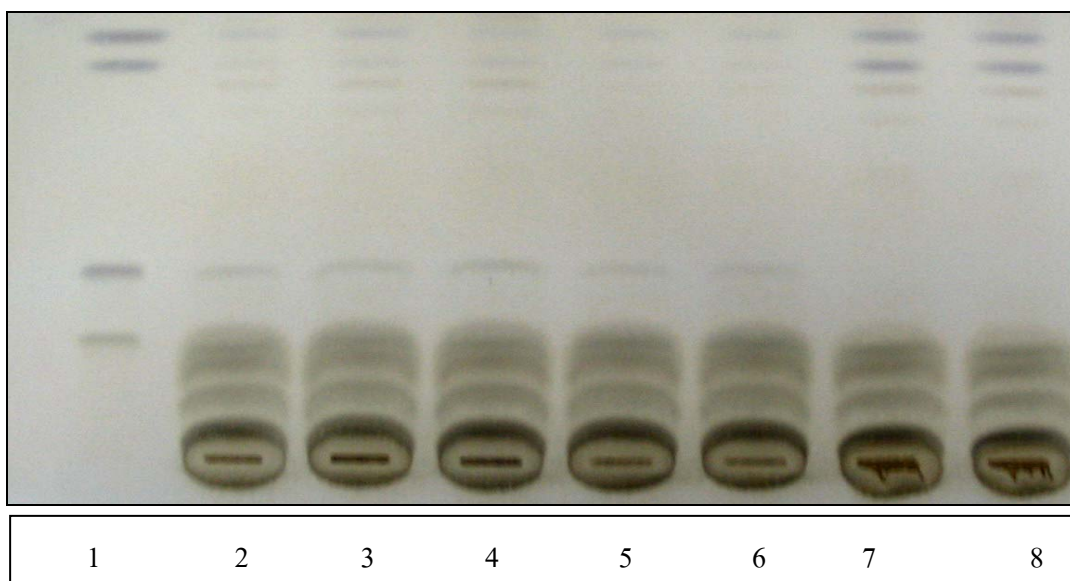
ตัวอักษร a-b ที่แตกต่างในแนวนอนของไทรเทอร์ปีนระหว่างตัวอย่างหมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

N/A หมายถึง ไม่พบสารไทรเทอร์ปีน

เมื่อนำบัวบกผ่านการแปรรูปทั้ง 5 วิธีแยกสารประกอบไทรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด ด้วย HPTLC พบสารไทรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด ในตัวอย่างบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง บัวบกทำแห้งแบบถาด น้ำชาบัวบก แต่ไม่พบสารเอเชียติโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์ในตัวอย่างน้ำบัวบก และน้ำบัวบกผง จากผลการทดลองดังกล่าวจึงศึกษาผลของความร้อนที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรส์น้ำบัวบก (85 องศาเซลเซียส 3 นาที) หรือเอนไซม์ที่มีผลต่อการไฮโดรไลซิส สารไทรเทอร์ปีนไกลโคไซด์

(เอเชียติโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์) ให้เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดเอเชียติก และกรดมาเดลาสสิก) โดยการตรวจสอบในเครื่องต้มชาบวบกซึ่งพบปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด เตรียมตัวอย่างโดยนำน้ำชาบวบกต้มพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 3 นาที และน้ำชาบวบกปั่นผสมกับบวบกสด

จากผลการทดลองเปรียบเทียบผลของความร้อนต่อการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (ภาพที่ 24) ระหว่างน้ำชาบวบก Track ที่ 2-4 และน้ำชาบวบกต้มพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 3 นาที Track ที่ 5-6 พบว่าความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 3 นาที มีผลทำให้สารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดในชาบวบกมีความหนาแน่นของสีลดลง แต่ไม่มีผลต่อการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียติโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์) ให้เป็นไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดเอเชียติก และกรดมาเดลาสสิก) และเมื่อเปรียบเทียบผลของเอนไซม์ต่อการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ ระหว่างน้ำชาบวบก Track ที่ 2-4 และน้ำชาบวบกปั่นผสมกับบวบกสด Track ที่ 7-8 พบว่าไม่มีแถบสีของไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียติโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์) ในตัวอย่างน้ำชาบวบกปั่นผสมกับบวบกสด Track ที่ 7-8 แต่พบว่ามี ความหนาแน่นของแถบสีไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดเอเชียติก และกรดมาเดลาสสิก) เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ในบวบกสดจะไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียติโคไซด์ และมาเดลาสโซไซด์) ให้เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดเอเชียติก และกรดมาเดลาสสิก) Track ที่ 7-8 ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 23 HPLC fingerprints โดยลำดับที่ 1: สารมาตรฐานผสม (มาเคลาสโซไซค์ เอเชียดิโคไซค์ กรดมาเคลาสสิก และกรดเอเชียดิก) แถวที่ 2-4: น้ำชาบัวบก แถวที่ 5-6: น้ำชาบัวบกต้มพาสเจอร์ไรส์ และแถวที่ 7-8: น้ำชาบัวบกปั่นผสมกับบัวบกสด

จากผลการทดลองพบว่าการเตรียมน้ำชาบัวบกโดยนำบัวบกสดปั่นผสมกับน้ำ ทำให้เอนไซม์ในบัวบกสดไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียดิโคไซค์ และมาเคลาสโซไซค์) เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคนซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Kawamura *et al.* (1988) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของสาร momordin II (ไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์) เป็น momordin I (ไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน) ในรากแห้งและรากสดของพืชปะเภทน้ำเต้า (*Momordica cochinchinensis*) เมื่อนำรากแห้งและรากสดโฮโมจิไนส์กับตัวทำละลายน้ำ หรือ เมทานอลผสมน้ำ พบว่าในตัวทำละลายน้ำ 30% เมทานอล และ 60% เมทานอล เอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterases) จะไฮโดรไลซิสเปลี่ยนให้ momordin II เป็น momordin I และสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2002) ศึกษาการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนของโสม (*Panax ginseng*) โดยสกัดเอนไซม์ ginsenoside- α -arabinofuranase จากรากสดของโสม พบว่าเอนไซม์ ginsenoside- α -arabinofuranase ไฮโดรไลส์น้ำตาล α -(1,6)-L-arabinofuranide ของสารไตรเทอร์ปีน ginsenoside Rc เปลี่ยนเป็นสารไตรเทอร์ปีน ginsenoside Rc

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไตรเทอร์ปีนในผลิตภัณฑ์บัวบกต่างๆ โดยเมื่อรับประทานบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบัวบกทำแห้งแบบตากในหน่วยบริโภค 100 กรัมน้ำหนักแห้งได้รับปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดมากกว่าการคั้นน้ำชาบัวบก น้ำบัวบก และน้ำบัวบกผง ในหน่วยบริโภค 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 15) ซึ่งตัวอย่างน้ำชาบัวบก น้ำบัวบก และน้ำบัวบกผง จะได้รับปริมาณไตรเทอร์ปีนรวมน้อยมาก (0.2-1.2 มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร) ซึ่งการบริโภคน้ำบัวบก และน้ำบัวบกผงไม่ได้รับเอเชียดิโคไซด์ และมาเดกาสโไซไซด์

เมื่อพิจารณาผลของไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดในแต่ละผลิตภัณฑ์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความร้อนสูง มีปริมาณไตรเทอร์ปีนรวมลดลง โดยน้ำบัวบกผง น้ำบัวบก และน้ำชาบัวบก ผ่านการแปรรูปโดยใช้ความร้อนอยู่ในช่วง 80-180 องศาเซลเซียสทำให้สารไตรเทอร์ปีนเสื่อมสลาย สำหรับบัวบกทำแห้งแบบตากได้รับความร้อนต่ำ (55 องศาเซลเซียส) จึงมีปริมาณไตรเทอร์ปีนรวมสูง แต่ไม่มากเท่ากับบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้รับความร้อนจากการแปรรูป โดยผลิตภัณฑ์บัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง บัวบกทำแห้งแบบตาก และน้ำชาบัวบกมีปริมาณมาเดกาสโไซไซด์สูงสุด (28.4-49.3%) รองลงมาคือ เอเชียดิโคไซด์ (27.1.4-40.9%) กรดมาเดกาสลิก (5.5-24.0%) และกรดเอเชียดิก (4.1-20.6%) ตามลำดับ สำหรับน้ำบัวบกและน้ำบัวบกผงมีปริมาณกรดมาเดกาสลิก (66.66 และ 82.92 %) สูงกว่า กรดเอเชียดิก (33.33 และ 18.18 %)

ตารางที่ 15 ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดของแต่ละผลิตภัณฑ์

ตัวอย่าง	ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด				
	กรดเอเชียติก	กรดมาเดกาสติก	เอเชียติโคไซด์	มาเดกาสโซไซด์	ไตรเทอร์ปีนรวม
บัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง ¹	38.89±5.82*	187.15±11.18	318.97±2.25	383.12±1.20	928.13±6.58
บัวบกทำแห้งแบบตาก ¹	119.8±3.4	139.9±19.2	157.9±43.6	165.3±1.1	583.0±63.6
น้ำชาบัวบก ²	0.6±0.2	0.8±0.1	5.9±0.2	7.1±0.2	14.4±0.1
น้ำบัวบก ²	0.6±0.1	1.2±0.2	N/A	N/A	1.8±0.1
น้ำบัวบกผง ²	0.2±0.1	0.9±0.2	N/A	N/A	1.1±0.3

หมายเหตุ *ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

N/A หมายถึง ไม่พบสารไตรเทอร์ปีน

¹มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง

²มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

5. ผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation analysis) ระหว่างปริมาณไตรเทอร์ปีนและสมบัติการต้านออกซิเดชันของบัวบก

5.1 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดและสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ

จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดของสารสกัดบัวบก (สารสกัดบัวบกทั้ง 5 ชนิดจากการทดลองที่ 2 และสารสกัดบัวบกด้วยวิธีการสกัดแบบเย็นและไฮโมจิโนส์จากการทดลองที่ 3) และสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ พบความสัมพันธ์ระหว่างสารไตรเทอร์ปีนและสมบัติการต้านออกซิเดชันทั้ง 4 วิธี โดยสารเอเชียติโคไซด์และมาเดลาสโซไซด์มีค่าสหสัมพันธ์ของทุกวิธีการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงสุดอยู่ในช่วง $r=0.9$ รองลงมา กรดมาเดลาสสิกอยู่ในช่วง $r=0.7-0.8$ (ตารางที่ 16) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของกรดเอเชียติกกับสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ ($r=0.07-0.2$) อาจเนื่องจากกรดเอเชียติกในบัวบกมีปริมาณน้อยจึงอาจแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันที่ต่ำกว่าสารไตรเทอร์ปีนชนิดอื่นที่พบในปริมาณที่สูงกว่า

เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมด (เอเชียติโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ กรดเอเชียติก และกรดมาเดลาสสิก) และสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้งหมดและสมบัติการต้านออกซิเดชันอยู่ในช่วง $r=0.8-0.9$ (ตารางที่ 21) ซึ่งแสดงว่าสารไตรเทอร์ปีนในบัวบกแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยเมื่อพิจารณาลักษณะของโครงสร้างสารไตรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิดพบว่า มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) เป็นองค์ประกอบส่วนมาก ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิล (OH) สามารถให้โปรตรอนแก่อนุมูลอิสระแสดงสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Inamdar *et al.*, 1996)

ตารางที่ 16 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ปริมาณไทรเทอร์ปีนหลักทั้ง 4 ชนิด และสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดบัวบก

สมบัติการต้านออกซิเดชัน	มาเดลาสโซไฮด์	เอเชียติโคไฮด์	กรดมาเดลาสสิก	กรดเอเชียติก	ไทรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด
สมบัติการให้อิเล็กตรอน					
(Total Phenols Assay)	0.900**	0.943**	0.753**	0.079	0.861**
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	0.943**	0.975**	0.816**	0.171	0.911**
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	0.910**	0.950**	0.769**	0.091	0.872**
สมบัติการให้โปรตอน (H-ORAC)	0.950**	0.967**	0.851**	0.249	0.926**

หมายเหตุ ** หมายความว่าค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 0.01 ตามลำดับ

5.2 ความสัมพันธ์สมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธีต่าง ๆ

เมื่อพิจารณาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการต้านออกซิเดชันวิธีต่างๆ พบว่าสมบัติการต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กันของทุกวิธี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 17) โดยวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี Total phenols จะมีความสัมพันธ์ดีมาก ($r > 0.98$) เนื่องจากกลไกในการเกิดปฏิกิริยาเป็นกลไกเดียวกัน คือเป็นวิธีการที่วัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (based on single electron transfer (SET) reaction) (Huang *et al.*, 2005) และเมื่อวิธี DPPH กับวิธี ABTS พบความสัมพันธ์ที่ดีมากเช่นกัน ($r > 0.99$) เนื่องจากทั้ง 2 วิธีเป็นการวัดค่าสมบัติการต้านออกซิเดชันแบบเดียวกันคือการวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้พบว่าความสัมพันธ์การต้านออกซิเดชันที่ดีมากของวิธี ORAC กับวิธีอื่น ($r > 0.96$) ถึงแม้จะเป็นวิธีการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยกลไกที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธี ORAC เป็นวิธีที่วัดการแลกเปลี่ยนอะตอมไฮโดรเจน (based on hydrogen atom transfer (HAT) reaction) (Prior *et al.*, 2003)

ตารางที่ 17 ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างสมบัติการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัดบัวบกที่ตรวจสอบด้วยวิธีต่างๆ

สมบัติการต้านออกซิเดชัน	สมบัติการให้อิเล็กตรอน (Total Phenols Assay)	สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	0.986**		
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	0.988**	0.991**	
สมบัติการให้โปรตอน (H-ORAC)	0.967**	0.978**	0.971**

หมายเหตุ ** หมายความว่าค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 0.05 และ 0.01 ตามลำดับ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารสำคัญที่แสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุด คือตัวทำละลาย 80% เมทานอล โดยสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีแบบปั่นละเอียดแสดงสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดสูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีเขย่า 24 ชั่วโมง โดยสารสกัด 80% เมทานอลแบบปั่นละเอียดประกอบด้วยสารมาเดลาสโซไซด์ (41.3% ของปริมาณสารไตรเทอร์ปีนรวมทั้งหมด) รองลงมาคือ เอเชียดิโคไซด์ (34.4%) กรดมาเดลาสสิก (20.1%) และกรดเอเชียดิก (4.2%) ตามลำดับ เมื่อนำบวบกผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีต่างๆ พบว่าความร้อนมีผลต่อปริมาณไตรเทอร์ปีน และสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยตัวอย่างบวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งมีสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณไตรเทอร์ปีน (มาเดลาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) สูงกว่าบวบกทำแห้งแบบตาก สำหรับบวบกทำแห้งแบบตากมีสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าน้ำชาบวบก ส่วนน้ำบวบกมีสมบัติการต้านออกซิเดชันต่ำกว่า แต่พบปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าน้ำบวบกผง ในตัวอย่างบวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง บวบกทำแห้งแบบตาก และน้ำชาบวบกพบปริมาณสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด (มาเดลาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียดิก) แต่ในตัวอย่างน้ำบวบกและน้ำบวบกผงพบเฉพาะกรดเอเชียดิก และกรดมาเดลาสสิก โดยการกระจายตัวของมาเดลาสโซไซด์ เอเชียดิโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียดิกในบวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง บวบกทำแห้งแบบตาก และน้ำชาบวบก คือ 28.4-41.3%, 27.1-34.4%, 5.6-20.1% และ 4.2-20.6% ตามลำดับ สำหรับน้ำบวบกและน้ำบวบกผงมีปริมาณกรดมาเดลาสสิก (66.66% และ 82.92 %) สูงกว่า กรดเอเชียดิก (33.33% และ 18.18 %) ปริมาณสารไตรเทอร์ปีน (เอเชียดิโคไซด์ มาเดลาสโซไซด์ และกรดมาเดลาสสิก) และสมบัติการต้านออกซิเดชันทั้ง 4 วิธี มีค่าสหสัมพันธ์ของทุกวิธีการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงสุดอยู่ในช่วง $r=0.7-0.9$

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารไตรเทอร์ปีนในบัวบกด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันรวมถึงผลของการแปรรูปบัวบกเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง พบว่ามีอิทธิพลจากเอนไซม์ หรือความร้อนต่อการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (มาเดคาสอไซด์ และเอเชียติโคไซด์) เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดมาเดคาสสิก และกรดเอเชียติก) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปควรมีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างด้วย รวมทั้งควรมีการควบคุมอายุของบัวบก แหล่งที่มา รวมถึงควรแยกส่วนใบ ก้าน และราก ในการวิเคราะห์เพราะแต่ละส่วนของใบบัวบกมีปริมาณสารไตรเทอร์ปีนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าการแปรรูปบัวบกเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมีผลทำให้สารไตรเทอร์ปีนลดลง ดังนั้นควรบริโภคบัวบกแบบสดหรือบัวบกที่ผ่านความร้อนต่ำ สำหรับตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด คือ 80% เมทานอล แต่สำหรับตัวทำละลาย 80% เอทานอลสามารถสกัดสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดได้เช่นกัน ดังนั้นหากนำสารสกัดไตรเทอร์ปีนไปใช้ประโยชน์ในระบบอาหารอาจใช้ตัวทำละลาย 80% เอทานอลในการสกัดซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัลยา เลหาสงคราม, บดินทร์ เตชะรัตนไกร และ สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ. 2550. ผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของน้ำสกัดจากสมุนไพรมะขาม, ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, นครศรีธรรมราช.
- ชัยเดช อินทร์ชัยศรี, กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และ สุกมา สามงามน้อม. 2548.ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดของสมุนไพรมะขามชนิดต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของเอดส์ในโคนม, ใน บทคัดย่อการประชุมวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 4, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- เชษฐา ใจใส. 2546. เกล็ดลับการแปรรูปน้ำผลไม้-สมุนไพรมะขามให้มีคุณภาพ. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ. 272 หน้า.
- พรณี ลิ้มสวัสดิ์ และ จีระวรรณ หัสโรจน์. 2542. อาหารธรรมชาติ...อาหารสมุนไพรมะขาม. สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุข, โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ. 64 หน้า.
- คำเกิง ปฐมวณิชช์. 2541. อาหารชะลอความแก่. นิตยสารไอส์มอ. 19 (4): 76.
- วรางคณา โล่ห์เจริญกุล และ อรัญญา มโนสร้อย. 2547. การพัฒนาตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากบัวบกและหอมหัวใหญ่เพื่อรักษาแผลเป็น. โครงการให้ทุนสนับสนุนโครงการอุตสาหกรรม (irpus) R10033/47.
- วันดี กฤษณพันธ์. 2541. สมุนไพรมะขาม. ครั้งที่ 3. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- AOAC. 2002. **Official Method of the Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, Virginia, U.S.A.

- Asakawa, Y., R. Matsuda and T. Takemoto. 1982. Mono- and sesquiterpenoids from hydrocotyle and *Centella* species. **Phytochem.** 21: 2590-2592.
- Asean countries. 1993. **Standard of Asean Herbal Medicine.** 2nd ed. Assara Buana printing, Jakata, Indonesia.
- Babu, T.D., G. Kuttan and J. Dadkkla. 1995. Cytotoxic and anti-tumor properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. **J. Ethnopharmacol.** 48: 153-157.
- Bhattacharyya, S.C. 1956a. Constituents of *Centella asiatica*: part I. Examination of the Ceylonese variety. **J. Ind. Chem. Soc.** 33 (8): 579-586.
- _____. 1956b. Constituents of *Centella asiatica*: part III. Examination of the Indian variety. **J. Ind. Chem. Soc.** 33: 893-898.
- Boiteau, P. and A.R. Ratsimamanga. 1956. L'asiaticoside extrait de "*Centella asiatica*" et ses emplois therapeutiques dans la cicatrisation des plaies experimentales etrebelles (lipre, tuberculose cutanee et lupus). pp. 6-7. In K. Pramongrit, ed. **Active Constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban in Thailand.** M. S. Thesis, Mahidol University.
- Bontems, J.E. 1941. A new heteroside, asiaticoside, isolated from hydrocotyle Asiatica (Umbelliferae). **Bull. Sci. Pharmacol.** 49: 186.
- Buhler, D.R. and C. Miranda. 2000. **Antioxidant activities of flavonoids web site.** Antioxidant Activities of Flavonoids. Available Source: <http://Ipi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>, April 10, 2008.

- Bunpo, P., K. Kataoka, H. Arimochi, H. Nakayama, T. Kuwahara, Y. Ohnishi and O. Vinitketkumuen. 2005. *Centella asiatica* extract induces cell cycle arrest in Caco-2 human colon cancer cells. **Chiang Mai. Med. Bull.** 44 (1): 21-28.
- Castellani, C., A. Marai and P. Vacchi. 1981. La *Centella asiatica*. **Boll. Chim. Farm.** 120: 570-605.
- Chan, H.W.S. 1987. **Autooxidation of unsaturated lipids**. Academic Press Inc., London.
- Chang, S.S., B. Ostric-Matijasevic, O.A.L. Hseih and C.L. Huang. 1997. Natural antioxidants from rosemary and sage. **J. Food Sci.** 42: 1102–1104.
- Chatterjee, I.K., A. Chakraborty and M. Pathak. 1992. Effect of plant extract *Centella asiatica* (Linn.) on cold restraint stress ulcer Rats. **Ind. J. Exp. Biol.** 30: 889-91.
- Chen, C.L. and W. Koo. 2000. Effect of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sci.** 67: 2657-2653.
- Choi, Y., S. M. Lee, J. Chun, H. B. Lee and J. Lee. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. **Food Chem.** 99: 381-387.
- Dhar, M.L., M.M. Dhar, B.N. Dhawan, B.N. Mehrotra and C. Ray. 1968. Screening of Indian plants for biological activity. **Indian J. Exp. Bio.** 6: 232-244.
- Dhorranintra, B. and C. Sangsirinavin. 1979. Cardiovascular effects of *Centella asiatica* glycoside. **Mahidol Univ. Ann. Res. Abstr.** 66.

- Diplock, A.T., J.L. Charleux, G.C. Willi, F.J. Kok, C.R. Evan and M. Roberfroid. 1998. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **Brit. J. Nutr.** 80: 77–112.
- Dutta, T. and U.P. Basu. 1968. Isothankunic acid: A new triterpene acid from *Centella asiatica*. **Bull. Natl. Inst. Sci. India.** 37: 178.
- Fried, B. and J. Sherma. 1986. **Thin Layer Chromatography Techniques and Application.** 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
- George, V.K. and J.L. Gnanarethinan. 1975. Free amino acids in *Centella asiatica*. **Curr. Sci.** 44 (21): 790.
- Gupta, S.S. 1962. A few observations on the psychotropic and anticonvulsant effects of some ayurvedic remedies. **Indian J. Physiol. Pharmacol.** 6: 25.
- Hamid, A.A., Z.M. Shah, R. Muse and S. Mohamed. 2002. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chem.** 77 (4): 465-469.
- Harborne, J. B. 1983. **Phytochemical Method: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.** 2nd ed. Chapman and Hall Ltd, New York, U.S.A.
- He, K., G.F. Pauli, B. Zheng, T. Wang, N. Bai, T. Peng, M. Roller and A. Zheng. 2006. *Cimicifuga* species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. **J. Chromatogr. A.** 1112 (1-2): 241-254.

- Hengsawas, S. 2004. **Formulation, Evaluation and Scale-up Production of *Centella asiatica* Extract Film Coated Tablets**. M.S. Thesis, Chulalongkorn University.
- Hiai, S., H. Oura and T. Nakajima. 1976. Colour reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. **Planta Medica**. 29: 116-122.
- Hostettmann, K. and A. Marson. 1995. **Saponins**. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Huang, D., B. Ou and R. L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.** 53: 1841-1856.
- Inamdar, P.K., A.B. Yeole, A.B. Ghogare and N.J. de Souza. 1996. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. **J. Chromatogr. A**. 742: 127-130.
- Isamah, G.K., Asagba, S.O. and A.O. Ekakiti. 2003. Lipid peroxidation, activities of superoxide dismutase and catalase during post-harvest deterioration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root tubers. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 52: 129 – 133.
- Kaito, T. Y. Hiramatsu, M. Hayashi and H. Fujimura. 1973. Effect of madecassol on wound healing. **Oya Yakuri**. 7 (6): 833-843.
- Kawamura, N., H. Watanabe and H. Oshio. 1988. Saponins from roots of *Momordica cochinchinensis*. **Phytochem.** 27: 3585-3591.
- Kim, D.O. and C. Y. Lee. 2002a. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry: Supplement 6**. John Wiley and Sons, Inc., New York.

- _____ and _____. 2002b. Extraction and isolation of polyphenolics, pp.1–12. *In* R.E. Wrolstad, ed. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, John Wiley and Sons, Inc., New York .
- _____ K.W. Lee, H.J. Lee and C.Y. Lee. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **J. Agric. Food Chem.** 50: 3713-3717.
- Klaunig, E. and L. M., Kamendulis. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 44: 239-267.
- Kursar, T., S. D., Torti and M. D. Dearing. 2005. Extraction of phenolic compounds from fresh leaves: A comparison of methods. **J. Chem Ecol.** 10: 117-125.
- Kulkarni, S.K. and A. Erma. 1992. Evidence for nootropic effect of BR-16A (Mentat), a herbal psychotropic preparation, in mice. **Indian J. Physiol. Pharmacol.** 36 (1): 29-34.
- Lawrence, J.C. 1967. The Morphological and pharmacological effect of asiaticoside upon skin in vitro and in vivo. **European J. Pharmacol.** 1: 414-424.
- Lester, G.E., D.M., Hodges, R.D. Meyer and K.D. Munro. 2004. Pre-extraction preparation (fresh, frozen, freeze-dried, or acetone powdered) and long-term storage of fruit and vegetable tissues: effects on antioxidant enzyme activity. **J. Agric. Food Chem.** 52: 2167-2173.
- Mahapunt, P. and S. Chaicharoentharwekit . 1987. **Determination of Active Constituents in *Centella asiatica***. B.Sc. Special Project Thesis, Faculty of Pharmacy, Mahidol University.

- Mahato, S.B., N.P. Sahu, P. Luger and E. Muller. 1987. Stereochemistry of a triterpenoid trisaccharide from *C. asiatica* : X-ray determination of the structure of asiaticoside. **J. Chem. Soc. Perkin Trans II.** 10: 1509-1515.
- Manzocco, L.S., S. Calligaris, D. Mastrocola, M.C. Nicoli and C.R. Lerici. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends Food Sci.** 11: 340-346.
- Maquart, F.X., G. Bellon, P. Gillery, Y. Wegrowski and J.P. Borel. 1990. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. **Connect tissue Res.** 24: 107-120.
- Mates, J.M., C.P. Gomez and I. N., Castro. 1999. Antioxidant enzymes and human disease. **Clin. Biochem.** 32: 595-603.
- McCall, M.R. and B. Frei. 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in human. **Free Rad. Biol. Med.** 26: 1034-1053.
- Montechchio, G.P., A. Samaden, S. Carbone, M. Vigotti, S. Siragusa and F. Piovella. 1991. *Centella asiatica* triterpenic fraction (CATTF) reduces the number of circulating endothelial cells in subjects with post phlebitic syndrome. **Haematologica.** 76: 256-259.
- Murakami, A., S. Jiwajinda, K. Koshimizu and H. Ohigashi. 1995. Screening for in vitro anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. **Cancer Lett.** 95 (1/2): 137-146.
- Nalini, K., A.R. Aroor, K.S. Karanth and A. Rao. 1992. Effect of *Centella asiatica* fresh leaf aqueous extract on learning and memory and biogenic amine turnover in albino rats. **Fitoterapia.** 63 (3): 232-237.

- Park, B.C., K.O. Bosire, E.S. Lee, Y.S. Lee and J.A. Kim. 2004. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma. **Cancer Lett.** 218 (1): 81-90.
- Pasich, B., Z. Kowalewski and A. Socha. 1968. The triterpenoid and sterol compounds in plant material: part XIII. The isolation of asiaticoside from the herb *Centella asiatica* (L.) Urb. using cationite. **Diss. Pharm. Pharmacol.** 20: 69-72.
- Pastor, N., H. Weinstein, E. Jamison and M. Brenowitz. 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. **J. Mol. Biol.** 304: 55-68.
- Perva, U.A., M. Skerget, Z. Knez, B. Weinreich, F. Otto and S. Gruner. 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chem.** 96: 597-605.
- Phongjit, C. 2003. **Subacute Effects of *Centella asiatica* Ethanolic Extract on Hepatic Cytochrome P450 and Clinical Blood Chemistry in Rat.** M.S. Thesis, Chulalongkorn University.
- Pinhas, H. 1969. Structure de l'acide madasiatique, nouvel acide triterpenique, isole de *Centella asiatica* L. pp. 6-7. In K. Pramongrit, ed. **Active Constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban in Thailand.** M. S. Thesis, Mahidol University
- Poizot, A. and D. Dumez. 1978. Modification of the healing kinetics after iterative excision in the rat. Action of titrated extract of *Centella asiatica* (TECA) on duration of healing. **CR. Hebd Seances Acad Sci D.** 286 (10): 789-792.
- Poli, G., G. Leonarduzzi, F. Biasi and E. Chiarotto. 2004. Oxidative stress and cell signaling. **Curr. Med. Chem.** 11: 1163-1182.

- Polonsky, I., E. Sach and E. Lederer. 1959. Sur la constitution chimique der la partie glucidique de l'asiaticoside. pp. 6-7. In K. Pramongrit, ed. **Active Constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban in Thailand.** M. S. Thesis, Mahidol University
- Pramongkit, K. 1995. **Active Constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban in Thailand.** M. S. Thesis, Mahidol University.
- Prior, R. L., H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou and R. Jacob. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.** 51: 3273-3279.
- Prun, N., B.B. Illel and J. Raynaud. 1983. Flavonoid glycosides from *Centella asiatica* L. (Umbelliferae). **Pharmazie.** 38 (6): 423.
- Ramaswamy, A.S., S.M. Periasamy and N.K. Basu. 1970. Pharmacological studies on *Centella asiatica*. **J. Res. Indian Med.** 4: 160.
- Randriaman, D., B. Diallo, F. Rakotoniriana, C. Rabemanantsou, K. Cheuk, A.M. Corbisier, J. Mahillon, S. Ratsimamanga and M. El Jaziri. 2007. Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: Application for ex situ conservation and clonal propagation. **Fitoterapia.** 78: 482-489.
- Rao, P.S. and T.R. Seshadri. 1969. Variation in the chemical composition of Indian samples of *Centella asiatica*. **Curr. Sci.** 38 (4): 77.
- Rastogi R.P., B. Sarkar and M.L. Dhar. 1960. Chemical examination of *Centella asiatica* Linn.: part I. Isolation of the chemical constituents. **J. Sci. Ind. Res-B.** 19 (7): 252-257.

- _____ and M.L. Dhar. 1963. Chemical examination of *Centella asiatica*. II. Brahmoside and brahminoside. **Indian J. Chem.** 1: 267-269.
- Sahu, N.P., S.K. Ray and S.B. Mahato. 1989. Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica*. **Phytochemistry**. 28 (10): 2852-2854.
- Sakina, M.R. and P.C. Dandiya. 1990. A psycho-neuropharmacological profile of *Centella asiatica* extract. **Fitoterapia**. 4: 291-296.
- Sanchez, M.C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological system. **Food Sci. Technol. Int.** 8 (3): 121-137.
- Sangsirinavin, C. 1978. **Pharmacology of Extract of *Centella asiatica***. M.S. Thesis, Mahidol University.
- Shin, H.S., G. Choi, M.H. Lee and K.N. Park. 1982. Clinical trails of madecassol (*Centella asiatica*) on gastrointestinal ulcer patient. **Korean J. Gastroenterol.** 14(1): 49-56.
- Shukla, A., A.M. Rasik, G.K. Jain, R. Shankar, D.K. Kulshrestha and B.N. Dhawan. 1999. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. **Ethnopharmacol.** 65: 1-11.
- Sing, B. and R.P. Rastogi. 1969. A reinvestigation of triterpenes of *Centella asiatica*. **Phytochemistry**. 8: 917-921.
- Singh, R. P., K. N.C. Murthy and G. K. Jayaprakasha. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **J. Agric. Food Chem.** 50: 81-86.

- Sribusarakum, A. 1997. **Chromatographic Determination of Active Constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban.** M.S. Thesis, Mahidol University.
- Sunikumar, K.C., S. Parameshwaraiah and H.G. Shirakumar. 1998. Evaluation of topical formulations of aqueous extract of *Centella asiatica* on upon wounds in rat. **Indian J. Exp. Biol.** 36: 569-572.
- Supawantanakul, S. 2003. **Effects of Asiaticoside on Low Potassium Medium Induced Cell Death in Cultured Rat Cerebellar Granule Neurons.** M.S. Thesis, Chulalongkorn University.
- Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. Chinese drugs of plant origin. **Springer Verlag** : 273-276.
- Tenni, R., G. Zanabon, M.D. de Agostini, A. Rossi, C. Bendotti and G. Cetta. 1988. Effect of the triterpenoid fraction of *Centella asiatica* on macromolecules of the connective matrix in human skin fibroblast culture. **Ital. J. Biochem.** 37: 69-77.
- Toor, R.K. and G.F. Savage. 2006. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. **Food Chem.** 94: 90–97.
- Topcu, G. and A. Ertas. 2007. Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. **ARKIVOC.** 195-208.
- Trueba, G. P., G. M. Sanchez and A. Giuliani. 2004. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. **Front. Biosci.** 9: 2029-2044.
- Tsurumi, K., Y. Haramatsu, M. Hayashi and H. Fujimura. 1973. Effect of madecassol on wound healing. **Oyo Yakuri.** 7 (6): 833-843.

- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol.** 160: 1-40.
- Vogel, H.G., N. de Souza and A. de Sa. 1990. Effect of terpenoids isolated from *Centella asiatica* on granuloma tissue. **Acta therapeutica.** 16: 285-298.
- WU, X., R.B. Gary, M.H. Joanne, B.H. David, E.G. Susan and L.P. Ronald. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **J. Agric. Food Chem.** 52: 4026-4037.
- Yang, D., Q. Wang, L. K., J. Jiang and T. Ying. 2007. Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nuficera* Gaertn) rhizome. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.** 7:158-163.
- Zainol, M.K., A. Abd-Hamid, S. Yusof and R. Muse. 2003. Antioxidant activity and total phenolic compounds of leaf root petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Food Chem.** 81: 575-581.
- Zhang, C., Yu, H., Bao, Y. and L. An. 2002. Purification and characterization of ginsenoside arabinofuranase hydrolyzing ginsenoside Rc into Rd from the fresh root of *Panax ginseng*. **Process Biochem.** 37: 793-798.
- Zheng, M.S. 1989. An experimental study of the anti HSV-II action of 500 herbal drugs. **J. Tradit Med.** 9: 113-116.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิเคราะห์ทางเคมี

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ก1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.1.2 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

1.1.3 ถ้วยอะลูมิเนียม (moisture can)

1.1.4 เดซิเคเตอร์ (desiccator)

1.2 วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา ที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 1.0-1.5 กรัม ลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแล้ว ทำแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 100 °ซ จนน้ำหนักคงที่

1.3 วิธีคำนวณ

สามารถคำนวณหาปริมาณร้อยละของความชื้นในตัวอย่างได้จากสมการด้านล่าง

$$\text{ร้อยละของความชื้น} = \frac{A}{B} \times 100$$

B

เมื่อ A แทน น้ำหนักของตัวอย่างที่หายไปหลังทำแห้ง (กรัม)

B แทน น้ำหนักของตัวอย่างก่อนทำแห้ง (กรัม)

ก2. การวิเคราะห์ปริมาณสารไตรเทอร์ปีนด้วยวิธี HPTLC

a. สภาวะในการวิเคราะห์

เครื่องสแกน TLC scanner II

HPTLC Glass Plate, Precoated Silica gel 60 F₂₅₄

Mobile phase Chloroform:Methanol:Water (15:7:1 v/v/v)

Spray reagent 0.2% anthrone reagent in conc. sulfuric

Detector UV 600 nm

Plate width 20 mm

Band 8 mm

Start pos 15 mm

Between track 10 mm

Rate 4 sec/ μ l

b. สารเคมี

2.2.1 คลอโรฟอร์ม

2.2.2 เมทานอลบริสุทธิ์ เกรดสำหรับ HPLC

2.2.3 สารมาตรฐานกรดเอซีติก

2.2.4 สารมาตรฐานกรดมาเลคาสสิก

2.2.5 สารมาตรฐานเอซีติโคไซด์

2.2.6 สารมาตรฐานมาเลคาสไซไซด์

2.2.7 แอนโทรน รีเอเจนต์

2.2.8 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

2.3 วิธีการวิเคราะห์

2.3.1 นำสารสกัดมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

2.3.2 เตรียมเฟสเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 15:7:1 v/v/v ใส่ลงในแท็งก์ ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้สารอิ่มตัว

2.3.3 หยดสารมาตรฐานมาตรฐานผสม (mix standard) กรดเอซีติก : กรดมาเดลาสติก :เอซีติกโคไซด์ : และมาเดลาสโคไซด์ปริมาณ 3-12 μ l โดยเตรียมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm และหยดตัวอย่างปริมาณ 1-35 μ l ลงบน HPTLC plate หลังจากนั้นเป่าให้แห้ง แล้วนำไปจุดลงในเฟสเคลื่อนที่

2.3.4 เมื่อเฟสเคลื่อนที่วิ่งถึงจุดที่กำหนดคือ 9 cm นำ HPTLC plate มาพักไว้ให้แห้ง

2.3.5 เมื่อ HPTLC plate แห้งแล้วนำไปสเปรย์ด้วย 0.2 % แอนโทรน รีเอเจนต์ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

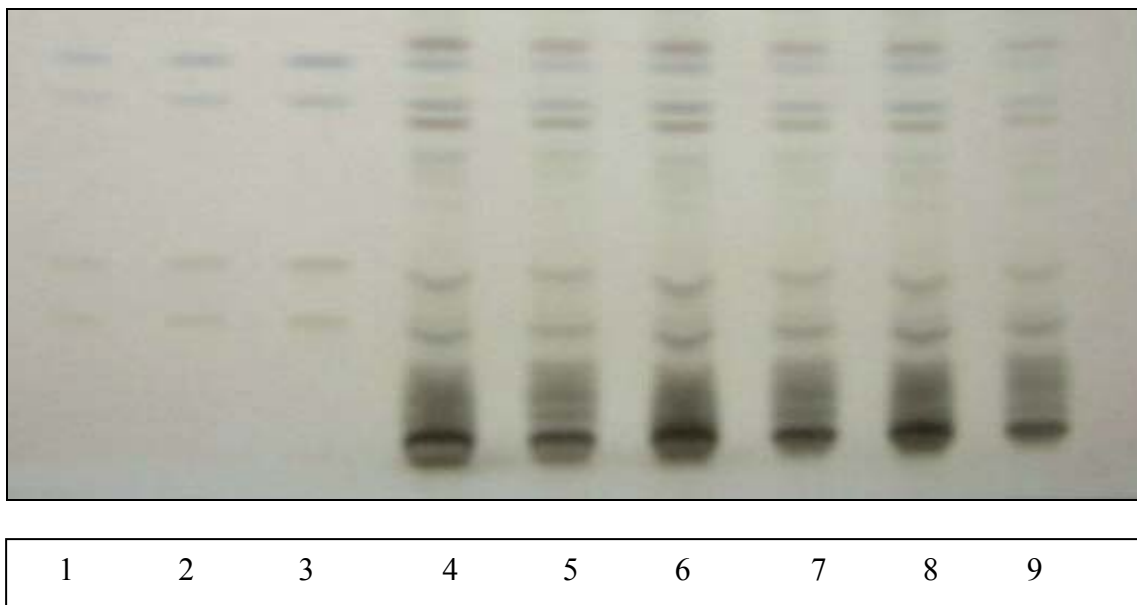
2.3.6 ให้ความร้อนกับ HPTLC plate ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้รีเอเจนต์ ทำปฏิกิริยากับสาร ไตรเทอร์ปีน เพื่อให้เกิดอนุพันธ์ของสาร ไตรเทอร์ปีนซึ่งจะทำให้เกิดสีขึ้นดังภาพภาคผนวก ที่ก1-ก5

2.4 วิธีการคำนวณ

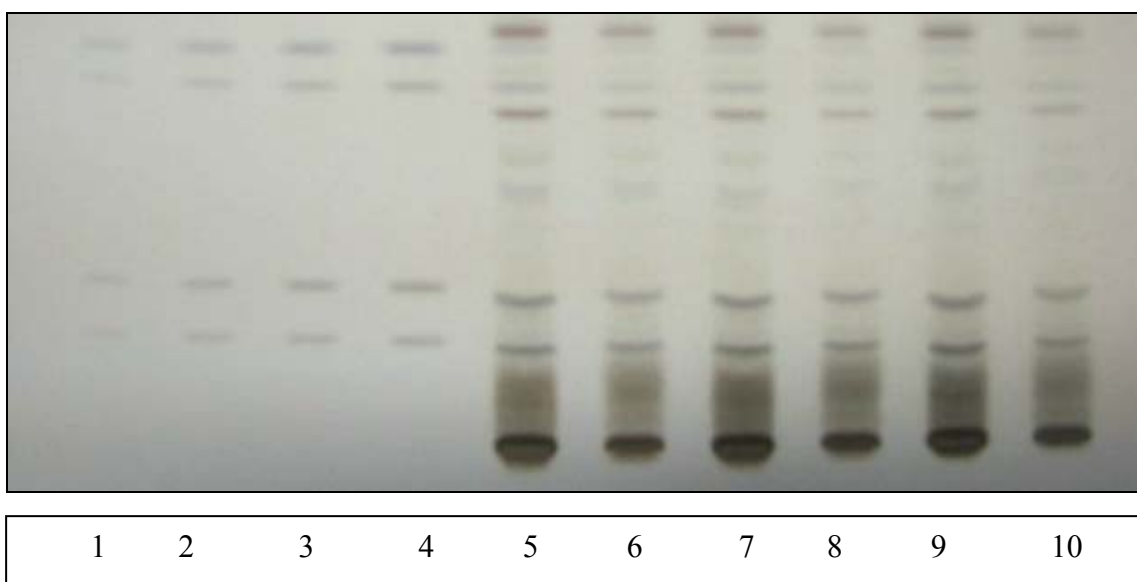
2.4.1 อ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารที่พบ ตรงกับระยะทางที่สารเคลื่อนที่ตรงกับสารมาตรฐาน (R_f) ดังภาพภาคผนวกที่ ก6-7 โดยพื้นที่ใต้กราฟถูกคำนวณออกมาจากโปรแกรม

$$R_f \text{ (Retention factor)} = \frac{\text{ระยะทาง (มิลลิเมตร) ที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทาง (มิลลิเมตร) ที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

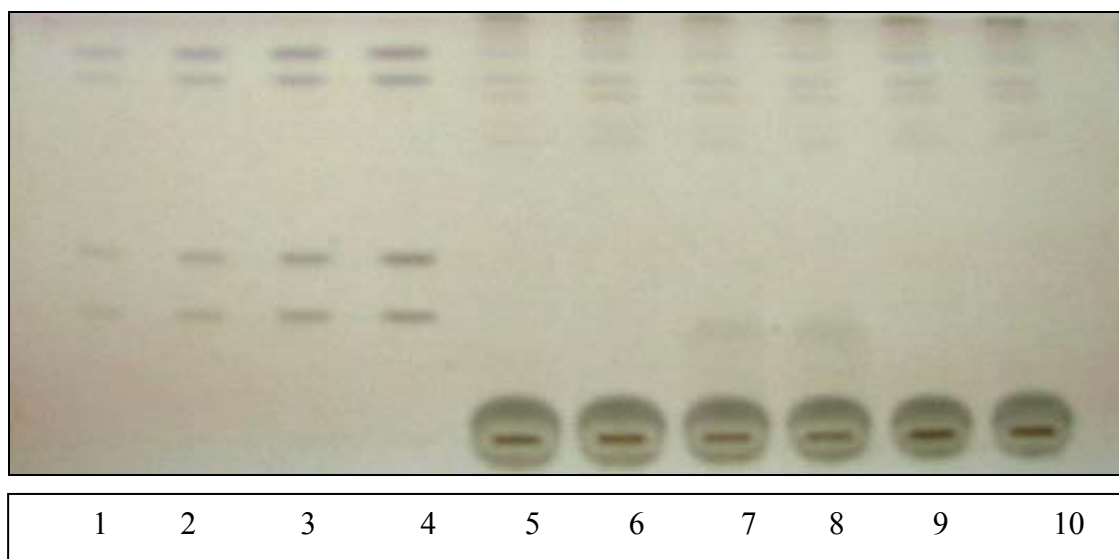
2.4.2 ปริมาณสารต่างๆ ที่พบในตัวอย่างคำนวณได้โดยแทนที่พื้นที่ใต้กราฟลงในสมการจากกราฟมาตรฐานดังแสดงภาพผนวกที่ก 8-11



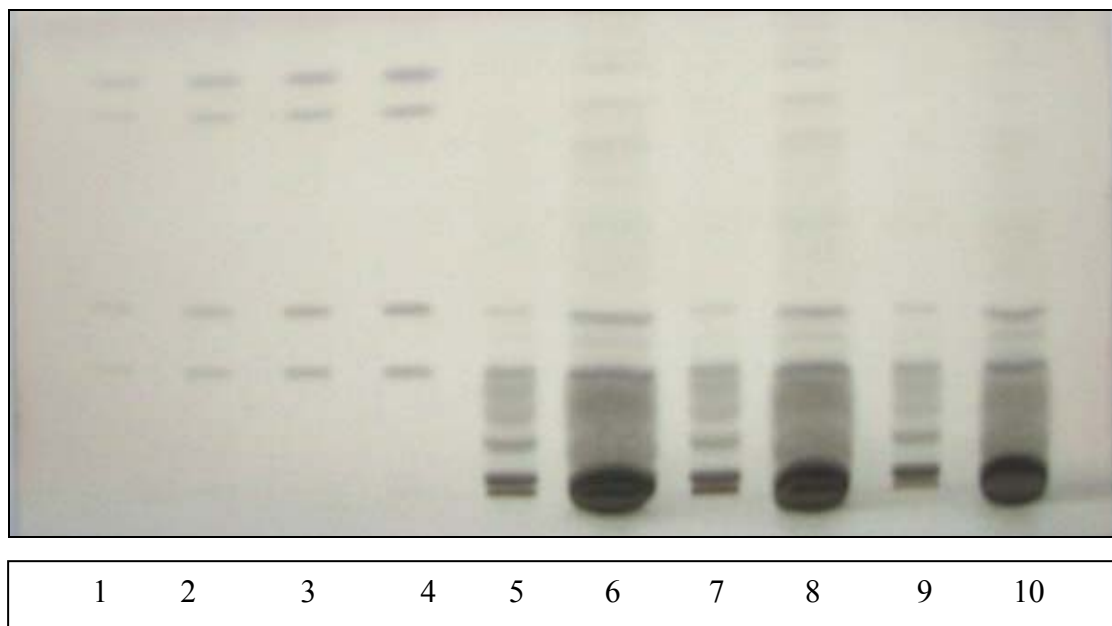
ภาพผนวกที่ ก1 HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-3: สารมาตรฐานผสม (มาเดลาสโซไซด์ เอเซียติโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเซียติก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-9: สารสกัดจากบัวบกอบแห้ง (35 μ l)



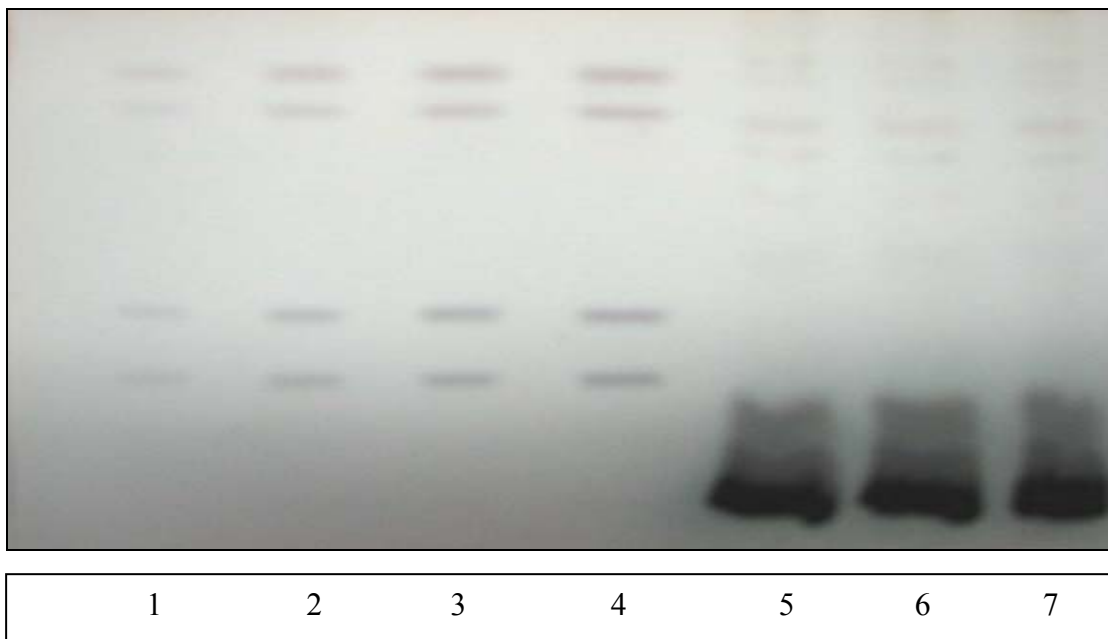
ภาพผนวกที่ ก2 HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดลาสโซไซด์ เอเซียติโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเซียติก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-10: สารสกัดจากบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็ง (25 μ l)



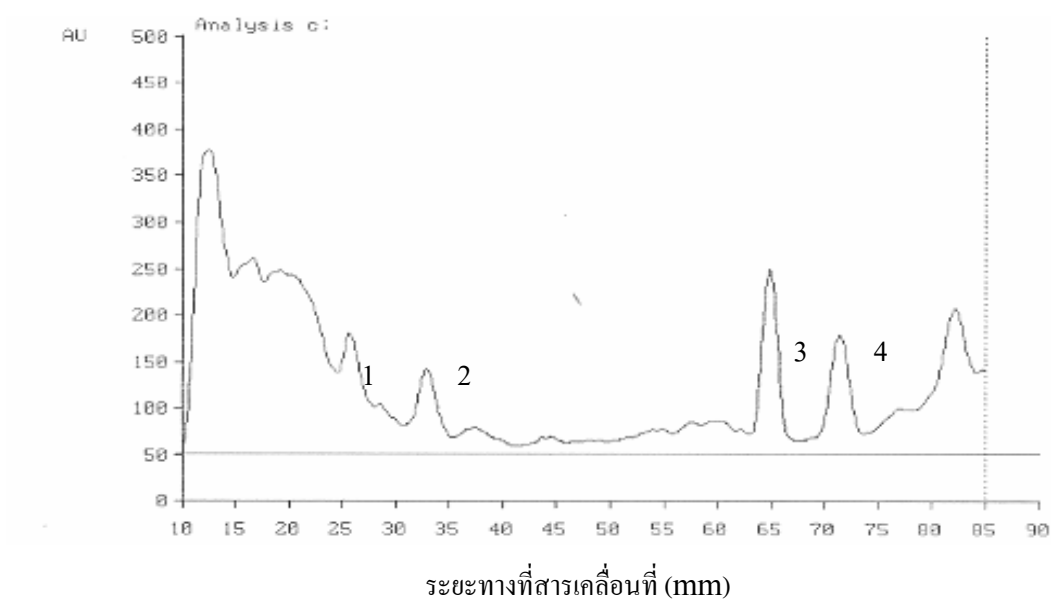
ภาพผนวกที่ ก3 HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดลาสโซไซด์ เอเซีย, ไดโคไซด์, กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเซียติก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9 และ 12 μ l) แถวที่ 5-10: เครื่องดื่มบ๊วกผ่านการพาสเจอร์ไรส์ (35 μ l)



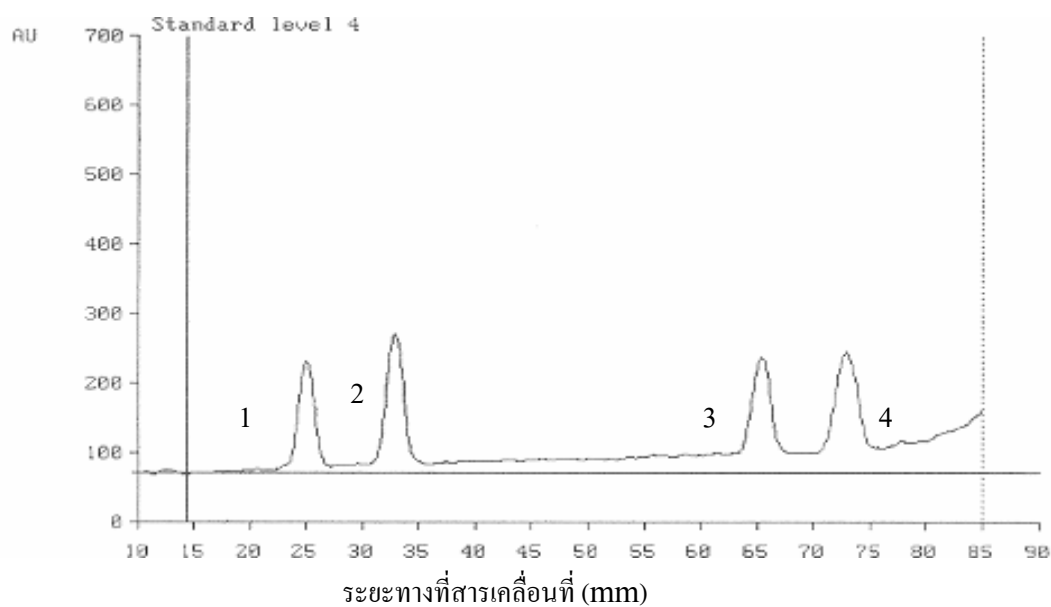
ภาพผนวกที่ ก4 HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดลาสโซไซด์ เอเซีย, ไดโคไซด์, กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเซียติก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm (3, 6, 9 และ μ l) แถวที่ 5-10: เครื่องดื่มชาบ๊วก (3 และ 35 μ l)



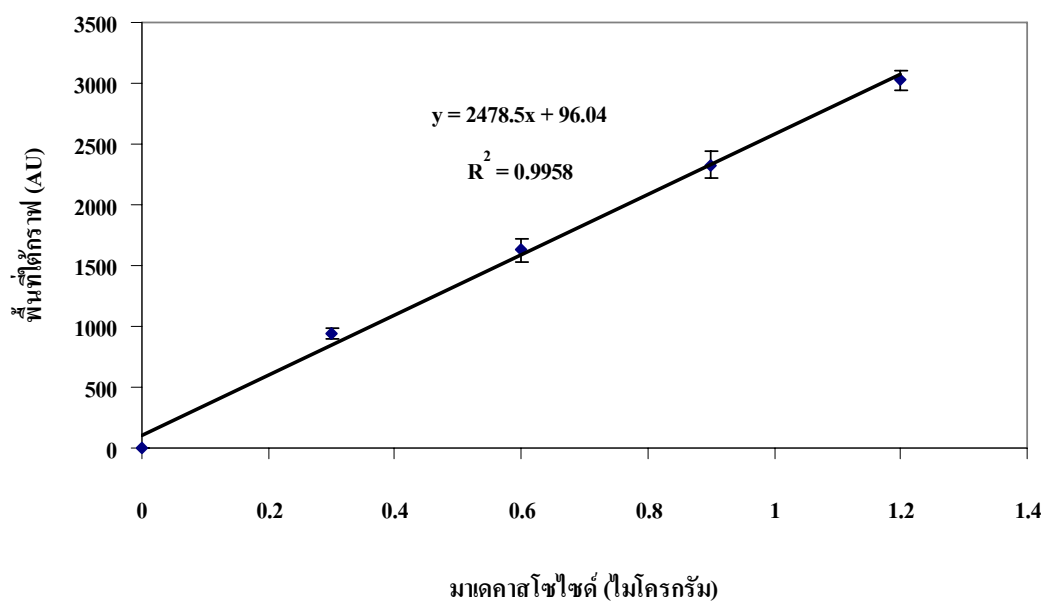
ภาพผนวกที่ ก5 HPTLC fingerprints โดยลำดับที่ 1-4: สารมาตรฐานผสม (มาเดลาสโซไซค์ เอเซียติโคไซด์ กรดมาเดลาสติก และกรดเอเซียติก) ความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm แถวที่ 5-7: บัวบกทำแห้งแบบพ่นฝอย (40 μ l)



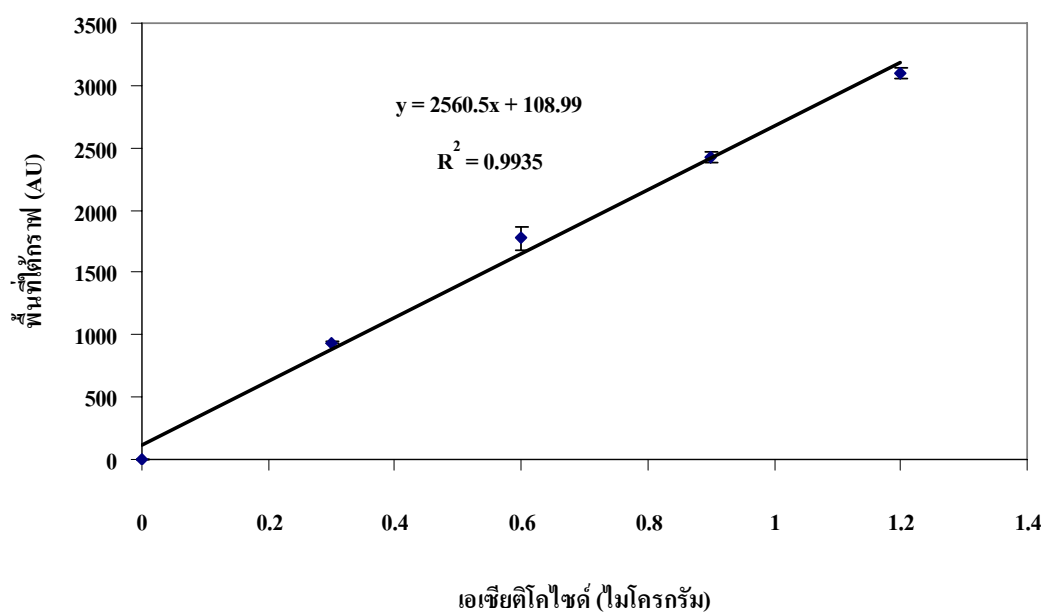
ภาพผนวกที่ ก6 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารสกัด 80% เมทานอลที่ความยาวคลื่น 600 nm, peak 1: มาเดลาสโซไซค์, peak 2: เอเซียติโคไซด์, peak 3: กรดมาเดลาสติก, peak 4: กรดเอเซียติก



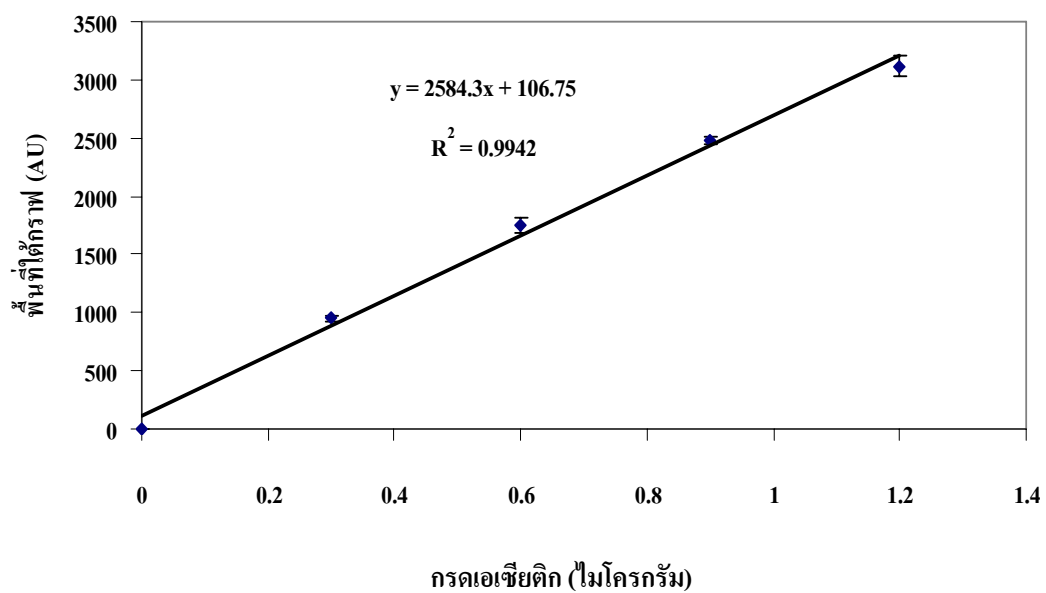
ภาพผนวกที่ ก7 ตัวอย่างโครมาโตแกรมสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นทุกตัว 100 ppm ที่ความยาวคลื่น 600 nm, peak 1: มาเดคาสโซไซด์, peak 2: เอเชียติโคไซด์, peak3: กรดมาเดคาสติก, peak 4: กรดเอเชียติก



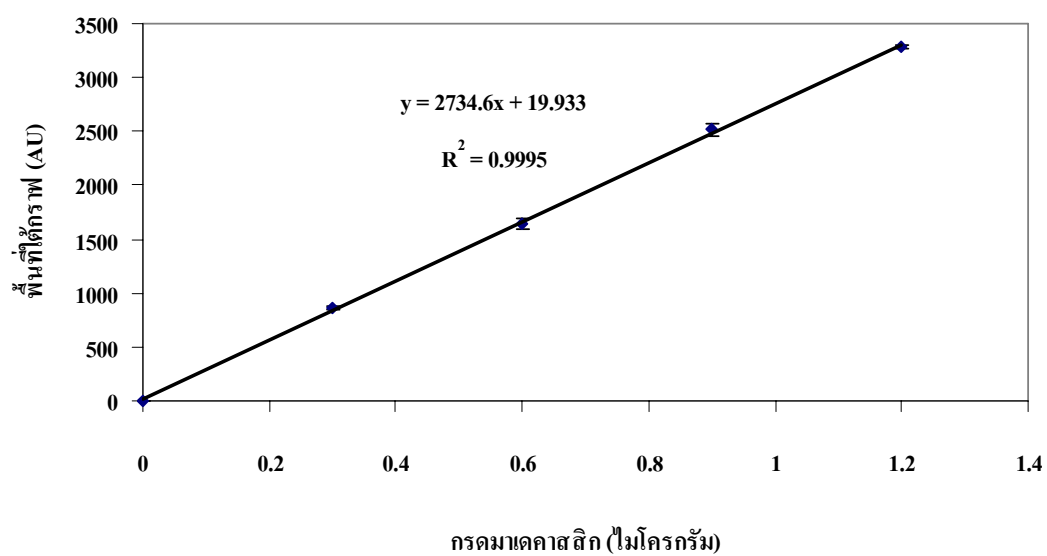
ภาพผนวกที่ ก8 กราฟมาตรฐานของมาเดคาสโซไซด์



ภาพผนวกที่ ก9 กราฟมาตรฐานของเอเซียติโคไซด์



ภาพผนวกที่ ก10 กราฟมาตรฐานของกรดเอเซียติก



ภาพผนวกที่ ก11 กราฟมาตรฐานของกรดมาเดคาสสิก

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมสารต้านออกซิเดชัน

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

ข1. การวิเคราะห์สมบัติการให้อิเล็กตรอน (Total Phenols Assay)

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

1.1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

1.1.3 คิวเวต

1.1.4 หลอดทดลอง

1.1.5 ไมโครปิเปตขนาดช่วง 10-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารฟอลิน-ซีโอเคาทุ (Folin-Ciocalteu reagen)

1.2.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7

1.2.3 สารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid)

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1.3.1 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (แกน X) และความเข้มข้นของกรดแกลลิก (แกน Y) โดยความเข้มข้นของกรดแกลลิกอยู่ในช่วง 20-100 ppm ได้กราฟมาตรฐานดังภาพผนวกที่ ข1

1.3.2 ปิเปตสารสกัด 20 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 ไมโครลิตร

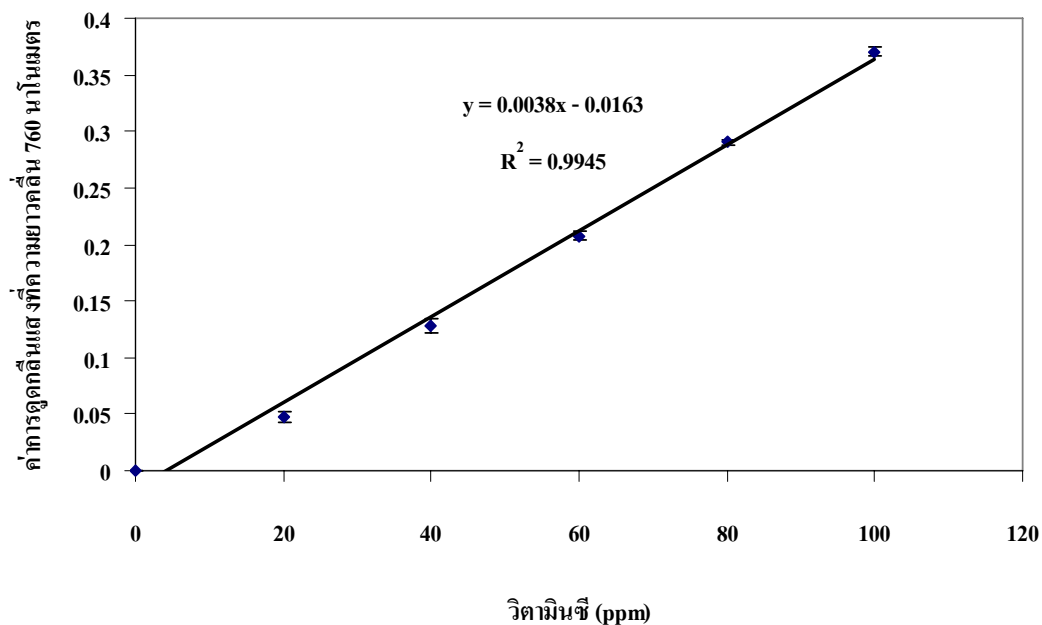
1.3.3 เติมสารฟอลิน-ซีโอเคาทุ 100 ไมโครลิตร ปล่อยให้ 6 นาที

1.3.4 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

1.3.5 เติมน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร

1.3.6 ปล่อยให้ 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

1.3.7 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงควบคุมโดยทำตามขั้นตอน 7.3.2-7.3.6 แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับการตรวจสอบสมบัติการให้อิเล็กตรอน
โดยวิธี Total phenols

ข2. การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

1.1.3 หลอดทดลอง

1.1.4 ไมโครปิเปตขนาดช่วง 10-100 และ 1000-5000 ไมโครลิตร

1.2 สารเคมี

1.2.1 เมทานอล

1.2.2 สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

1.2.3 สารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

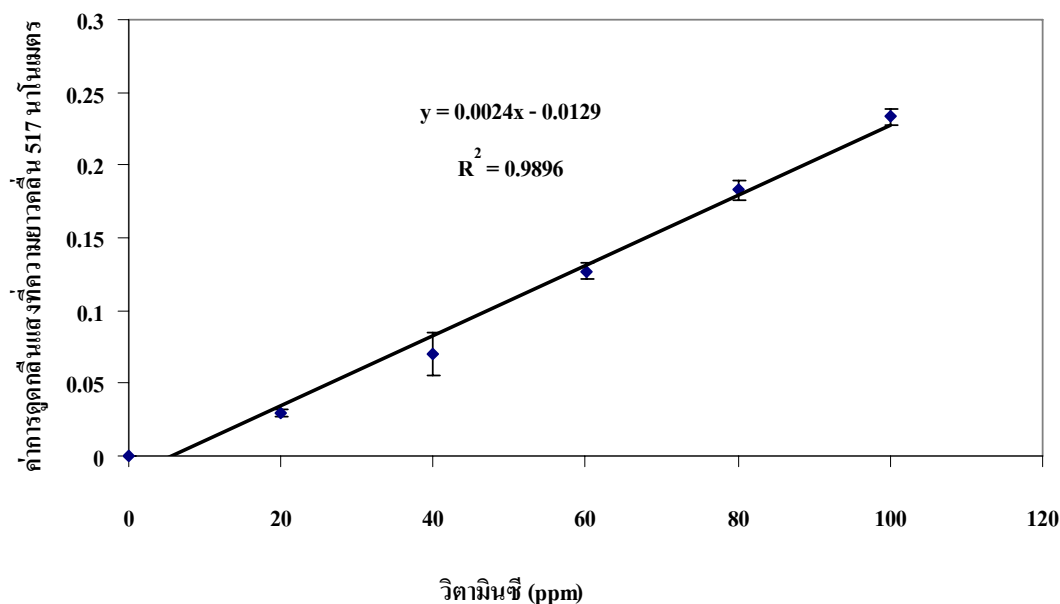
1.3 วิธีการวิเคราะห์

1.3.1 สร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซีระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (แกน X) และความเข้มข้นของวิตามินซี (แกน Y) โดยความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกอยู่ในช่วง 20-100 ppm ได้กราฟมาตรฐานดังภาพผนวกที่ ข2

1.3.2 นำสารสกัด 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ปล่อยให้ 20 นาที

1.3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

1.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงควบคุม (control OD) โดยทำตามข้อ 1.4.2-1.4.3 แต่ใช้สารละลายเมทานอล แทนสารสกัด



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของวิตามินซีสำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ข3. การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS

2, 2'-azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (ABTS Radical Scavenging Capacity)

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

1.1.3 หลอดทดลอง

1.1.4 ไมโครปิเปตขนาดช่วง 10-100 และ 1000-5000 ไมโครลิตร

1.1.5 อ่างน้ำให้ความร้อน

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

1.2.2 1.0 mM AAPH และ 2.5 mM ABTS

1.2.2 สารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

1.3 วิธีการเตรียมสารเคมี

1.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เตรียม 100 mM ได-โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (34.836 กรัม) และ 150 mM ของโซเดียมคลอไรด์ (17.532 กรัม) นำสารละลายทั้ง 2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 2000 มิลลิลิตร

1.2.2 เตรียม 100 mM โพแทสเซียม ได-ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (6.8045 กรัม) และ 150 mM ของโซเดียมคลอไรด์ (4.383 กรัม) นำสารละลายทั้ง 2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.2.3 เติมสารละลายข้อ 1.2.2 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaCl}$) ลงในสารละลาย 1.2.1 ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl}$) กวนให้เข้ากันโดยใช้ magnetic bar ใส่สารละลายข้อ 1.2.2 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaCl}$) จนกระทั่ง pH ได้ 7.4

1.2.4 เตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ โดยเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดนำไปต้มในอ่างน้ำให้ความร้อนจนกระทั่งอุณหภูมิของสารละลายถึง 68 องศาเซลเซียส

1.2.5 ชั่งสาร AAPH 27.117 มิลลิกรัม ความเข้มข้น 1.0 mM และชั่งสาร ABTS 137.175 มิลลิกรัม ความเข้มข้น 2.5 mM ใส่ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2.6 นำสารละลายอนุมูลอิสระต้มที่อ่างน้ำให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าแรงๆทุก 5 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายอนุมูลอิสระพักไว้ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.2.7 กรองสารละลายอนุมูลอิสระด้วย GHP Acrodisc® 25 mm Syringe Filter with 0.45 μ m GHP membrane

1.2.8 เจือจางสารละลายอนุมูลอิสระด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 0.65 ± 0.67 นาโนเมตร

1.4 วิธีการวิเคราะห์

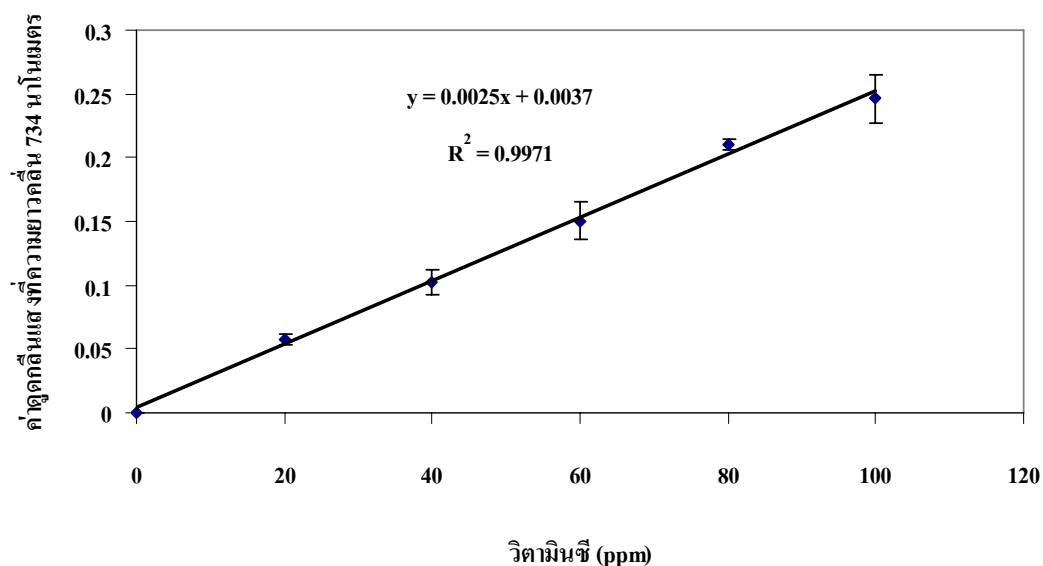
1.4.1 สร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซีระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (แกน X) และความเข้มข้นของวิตามินซี (แกน Y) โดยความเข้มข้นของ กรดแอสคอร์บิกอยู่ในช่วง 20-100 ppm ได้กราฟมาตรฐานดังภาพผนวกที่ ข3

1.4.2 นำสารสกัด 20 ไมโครลิตรใส่ในคิวเวต เติมสารละลายอนุมูลอิสระ (1.0 mM AAPH + 2.5 mM ABTS) ปริมาตร 980 ไมโครลิตร ปล่อยให้ 20 นาที

1.4.3 นำคิวเวตบ่มไว้ในอ่างน้ำให้ความร้อน ปล่อยให้ 10 นาที

1.4.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

1.4.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงควบคุม (control OD) โดยทำตามข้อ 1.4.2-1.4.3 แต่ใช้ สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 แทนสารสกัด



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของวิตามินซีสำหรับการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ABTS

ข4. การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ORAC

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay (ดัดแปลงจาก Prior *et al.*, 2003)

2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.1.3 ตู้ดูดควัน

2.1.4 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)

2.1.5 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง

2.1.6 เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence spectrophotometer) พร้อม well plate สีดำ

2.1.7 ไมโครปิเปตขนาดช่วง 5-20, 40-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร

2.2 สารเคมี

2.2.5 สารละลาย RMCD เข้มข้นร้อยละ 7 ในสารละลายอะซิโตน/น้ำ 50/50

2.2.6 สารละลายฟลูออเรสซิน

2.2.7 สารละลาย AAPH

2.2.8 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

2.2.9 สารมาตรฐาน Trolox

2.3 วิธีการเตรียมสารเคมี

2.3.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0 ชั่งโซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (มวลโมเลกุล 137.99) 4.00 กรัม รวมกับไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (มวลโมเลกุล 141.96) 6.53 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร วัดพีเอชและปรับให้ได้ 7.0

2.3.2 สารละลายฟลูออเรสซิน

FL #1 ชั่งสารฟลูออเรสซิน 0.0225 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

FL #2 ปิเปต FL #1 มา 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

FL working solution

ปิเปต FL #2 มา 320 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

2.3.3 สารมาตรฐาน Trolox (ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0)

Stock standard

ชั่ง Trolox 0.0062 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50

มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (T50)

ปิเปต Stock standard มา 1 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลาย

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (T25)

ปิเปต T50 มา 5 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5

มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์ (T12.5)

ปิเปต T50 มา 5 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 6.25 ไมโครโมลาร์ (T6.25)

ปิเปต T50 มา 5 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร

2.3.4 สารละลาย AAPH

ชั่งสาร AAPH 0.1720 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

2.5 วิธีการเตรียมสารสกัด

2.5.1 วิธีการเตรียมสารสกัดส่วนขอบไขมัน นำสารสกัดมาระเหยเหวกลงให้แห้ง เติมอะซิโตน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย RMCD 750 ไมโครลิตร เขย่าตัวอย่างจนละลายหมด เจือจางตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ ด้วย สารละลาย RMCD

2.5.2 วิธีการเตรียมสารสกัดส่วนที่ขอบน้ำ เจือจางสารสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

2.6 วิธีการวิเคราะห์

2.6.1 นำสารสกัด 20 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลต

2.6.2 อุ่นสารละลายฟลูออเรสซินที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที แล้วเติมลงในไมโครเพลตหลุมละ 200 ไมโครลิตร

2.6.3 ใส่ไมโครเพลตลงในเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงฟลูออเรสเซนซ์

2.6.4 กำหนดให้เครื่องเติมสารละลาย AAPH หลุมละ 37.5 และ 75 ไมโครลิตร

สำหรับส่วนขอบน้ำและส่วนขอบไขมันตามลำดับ โดยเริ่มเติมสาร AAPH ที่รอบที่ 4

2.6.5 อ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ทันที โดยมีการตั้งค่าได้แก่

No. of cycles 50

Cycle time (s) 65

No. of flashes 10

Excitation filter 480 nm

Emission filter 520 nm

Positioning delay (s) 0.2

Shaking width (mm) 3

Shaking mode orbital

Additional shaking 8 s after injection cycle

Injection speed (µl/s) 310

Injection cycle 4

Injection start time (s) 0.0

Target temperature 37.0

2.6.6 เติมสารฟลูออเรสซิน 200 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลตเพื่อให้เครื่องอ่านค่า gain adjustment

2.6.7 วัดค่าความเข้มแสงควบคุมโดยใช้ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารสกัด

2.6.8 สร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของ Trolox โดยใช้สารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์

2.7 วิธีการคำนวณ

2.7.1 คำนวณพื้นที่ใต้กราฟสุทธิตัวอย่าง ดังแสดงในสมการที่ 1

และ 2

2.7.2 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิแทนที่ในสมการของกราฟมาตรฐานของ Trolox โดยกราฟมาตรฐานของส่วนชอบไขมัน แสดงในภาพผนวกที่ ข4 และส่วนชอบน้ำแสดงในภาพผนวกที่ ข5

$$AUC = (0.5 + f_5/f_4 + f_6/f_4 + f_7/f_4 + \dots + f_i/f_4) CT \quad i = \text{sample blank} \dots \text{สมการที่ 1}$$

$$net AUC = AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{blank}} \dots \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ AUC = พื้นที่ใต้กราฟ (Area Under Curve)

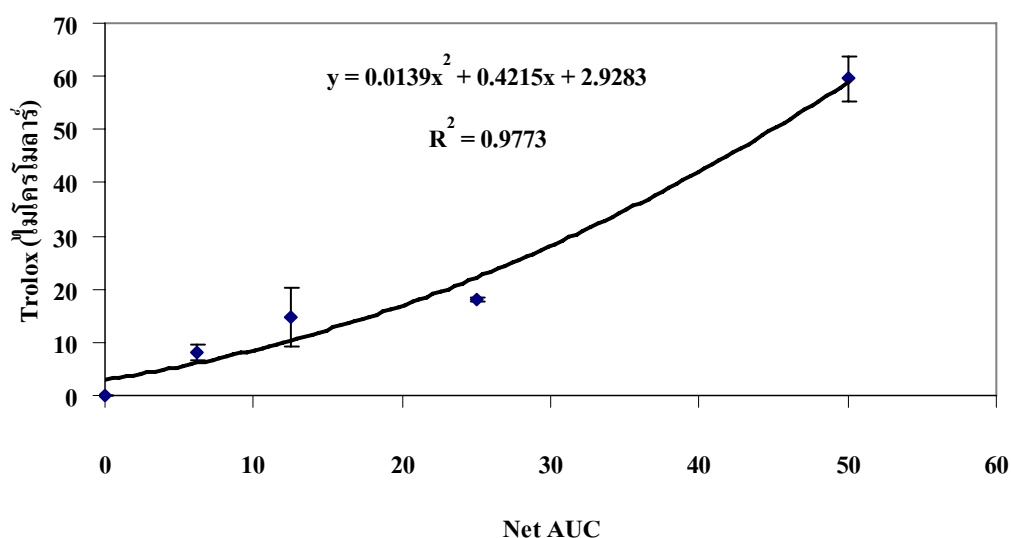
$4f$ = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้นโดยเริ่มอ่านที่

รอบที่ 4 (initial fluorescence reading at cycle 4)

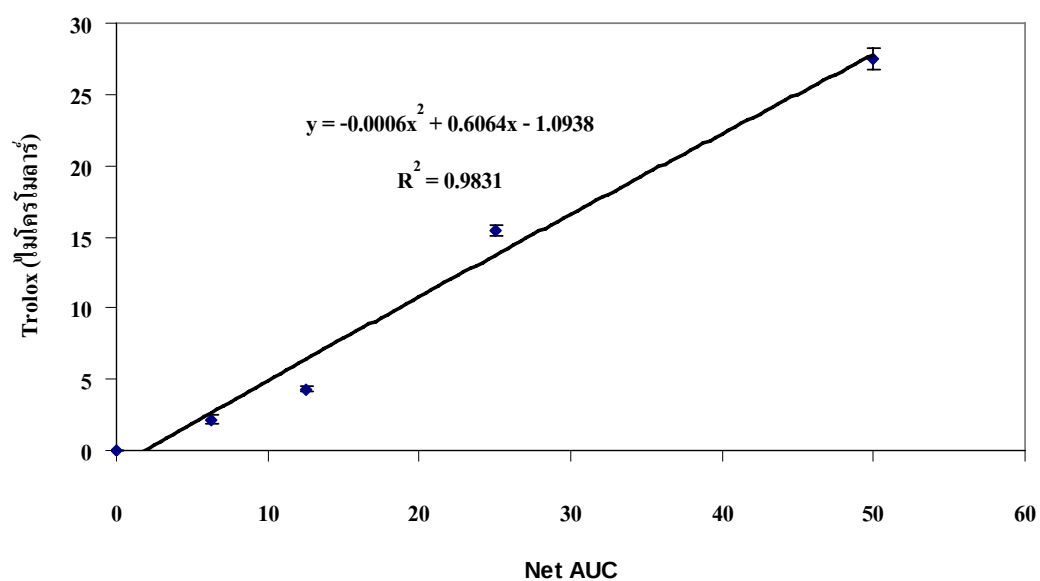
if = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่ออ่านที่รอบที่ i

(fluorescence reading at cycle i)

CT = เวลาที่ใช้ต่อรอบ มีหน่วยเป็นนาฬิกา (Cycle time)



ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานของ Trolox สำหรับสารสกัดส่วนที่ชอบน้ำในการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC



ภาพผนวกที่ ข5 กราฟมาตรฐานของ Trolox สำหรับสารสกัดส่วนที่ชอบไขมันในการศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ORAC

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาว นฤมล น้อยหอย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 3 กรกฎาคม 2525
สถานที่เกิด	อำเภอวัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร) ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร (พ.ศ. 2548)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์