



การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากดอกพญาบาทหลวง
BIOLOGICAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF EXTRACTS FROM
BAUHINIA TOMENTOSA L.

วรัวรัตน์ นาคศรีเจริญกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากดอกพญาบาทหลวง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

BIOLOGICAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF EXTRACTS FROM
BAUHINIA TOMENTOSA L.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากดอกพญากาหลง
ของ
วรัรัตน์ นำศรีเจริญกุล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญตา ฉัตรวิระสกุล)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลลนา คงคาเนรมิตร)
..... ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)	(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)
..... ที่ปรึกษาร่วม	
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา จิตตสุโข)	

ชื่อเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากดอกพญา กาหลง
ผู้วิจัย	วรัรัตน์ นาคศรีเจริญกุล
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญตา จันตรีระสกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภาพร เสรีเด่นชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา จิตตสุโก

การเพาะปลูกดอกไม้มีประโยชน์ในแง่ของการส่งเสริมสุขภาพและความงาม กลีบดอกไม้อุดมไปด้วยเม็ดสีและองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและเวชสำอาง ดอกของต้นพญากาหลงมีการเปลี่ยนสีที่จากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อดอกไม้เจริญเติบโตเต็มที่ สภาพแวดล้อมสามารถกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนสีและองค์ประกอบทางเคมีได้ พบว่าสารสกัดจากต้นพญากาหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถต้านมะเร็งและสมานแผลได้ งานวิจัยนี้ เราเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV) ที่ทำการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งได้ปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟีนอลิกคือ 18.13 ± 0.19 mg และ 18.01 ± 0.17 mg gallic acid equivalent/g of BW and BV extracts ปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์อยู่ที่ 76.70 ± 0.74 mg และ 97.21 ± 0.06 mg quercetin equivalent/g of BW and BV extracts การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีแสดงให้เห็นว่าสารสกัด BV มีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัด BW อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟีนอลิกเท่ากัน ทำการวิเคราะห์สารสกัดด้วยวิธี UHPLC-UV พบว่าสารสำคัญที่พบคือ rutin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ และมีปริมาณเท่ากับ 203.8 ± 1.1 mg/g และ 297.6 ± 4.7 mg/g of BW and BV extracts จะเห็นว่าสารสกัด BV มีปริมาณ rutin สูงกว่าสารสกัด BW อย่างมีนัยสำคัญเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติแบบ t-test ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ สารสกัด BV ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging, ABTS และการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของเฟอร์ริก (FRAP) ค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด BW และ BV คือ 117.67 ± 11.59 และ 93.36 ± 2.73 μ g/mL ตามลำดับ ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกพญากาหลงอาจส่งผลต่อปริมาณ rutin และฤทธิ์ทางด้านเวชสำอาง เช่น สารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด BV อาจมีมากกว่าสารสกัด BW

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ดอกไม้สีเหลือง, ดอกไม้สีม่วง, ต้นพญากาหลง

Title	BIOLOGICAL ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF EXTRACTS FROM <i>BAUHINIA TOMENTOSA</i> L.
Author	WAREERAT NUMSREECHAROENKUN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Assistant Professor Boonta Chutvirasakul
Co Advisor	Assistant Professor Vipaporn Sareedenchai
Co Advisor	Associate Professor Chuda Chittasupho

Floriculture can offer diversity in terms of beneficial health and beauty promotion. Flower petals are rich in pigments and phytochemicals with nutraceutical and cosmeceutical properties. The flowers of *Bauhinia tomentosa* L. are distinct in color alteration from yellow to violet for floral maturation. The environment can trigger color maturation and its phytochemical profiles. The extracts of *B. tomentosa* L. have been shown to have antimicrobial activities, and antitumor and wound healing qualities. In this work, we compared phytochemical contents, antioxidant, anti-tyrosinase activities of yellow (BW) and violet (BV) petal ethanolic extracts of *B. tomentosa* L. The total phenolic contents were 18.13 ± 0.19 mg and 18.01 ± 0.17 mg gallic acid equivalent/g of BW and BV extracts. The total flavonoid contents were 76.70 ± 0.74 mg and 97.21 ± 0.06 mg quercetin equivalent/g of BW and BV extracts. The phytochemical studies showed that the BV extract demonstrated significantly higher in total flavonoids contents than the BW extract but comparable for total phenolic contents. UHPLC-UV analysis of the extracts showed that the principal flavonoid was rutin and found to be 203.8 ± 1.1 mg/g and 297.6 ± 4.7 mg/g of BW and BV extracts. The BV extract contained significantly higher amount of rutin than the BW extract by t-test statistical analysis at a 95% confidence interval. Moreover, The BV extract also showed higher anti-tyrosinase activity and antioxidant powers by DPPH scavenging assay, ABTS and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The IC_{50} values of the mushroom tyrosinase inhibition of the BW and BV extracts were 117.67 ± 11.59 and 93.36 ± 2.73 μ g/mL, respectively. The results suggested that the chromatic alteration of *B. tomentosa* L. petals could affect the rutin contents and cosmeceutical activities such as antioxidants and anti-tyrosinase and the BV extract could be superior to the BW extract.

Keyword : antioxidant, anti-tyrosinase, yellow petal, violet petal, *Bauhinia tomentosa* L.

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความเมตตากรุณาช่วยเหลือ และความเอาใจใส่เป็นอย่างดี ตลอดจนให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับแก้ใช้ข้อบกพร่องจากคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญตา จัตุรัสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย และรองศาสตราจารย์ ดร.ชุตติ จิตตสุโก ที่ให้ความเมตตากรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้ความช่วยเหลือชี้แนะแนวทางในสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการทำปริญญานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา รวมทั้ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลลนา คงคาเนรมิต รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย และอาจารย์ ดร.ปัญญาดา ปัญญาทิพย์ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะต่างๆ เพิ่มเติมแก่ผู้วิจัย ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และกรรมการบริการหลักสูตรสาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวกชพร ต้นปิยะกุล และนางสาววรรษยา ขาวน้ำวน สำหรับสารสกัดดอกพญากาหลง รวมถึงนายกรกฤษณ์ สิงห์ป๋อง และนายอภิศวรรษ วันมา สำหรับข้อมูลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง ด้วยวิธี UHPLC-UV

ขอขอบคุณทุนพัฒนาบุคลากร จากคณะเภสัชศาสตร์ และทุนสนับสนุนการเข้าร่วมประชุม และการเสนอผลงานของบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษา และค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมประชุมและการเสนอผลงานของผู้วิจัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงคุณบิดามารดา และครูอาจารย์ที่อบรมสั่งสอนให้ความรู้รวมถึงกัลยาณมิตรทั้งหลายที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

วรัรัตน์ นำศรีเจริญกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ภูมิหลัง	1
1.2 ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
1.3 ความสำคัญของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
1.6 สมมติฐานงานวิจัย	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของพญากาหลง	5
2.2 การสกัดสารจากพญากาหลง	7
2.3 พฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพญากาหลง	7
2.4 สารกลุ่มฟีนอลิกและการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก	8
2.5 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์	9
2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	10
2.7 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	11

2.8 หลักการของ high performance liquid chromatography (HPLC) และ mass spectrometry (Liu et al., 2017)	13
2.9 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) (AOAC, 2016)	14
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการวิจัย	18
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	18
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	19
3.3 พื้นที่ใช้ในการทดลอง	20
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย	20
3.4.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากดอกพญากาหลง	20
3.4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	20
3.4.2.1 วิธี DPPH Scavenging assay	20
3.4.2.2 วิธี ABTS radical scavenging assay	21
3.4.2.3 วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay)	22
3.4.3 Mushroom tyrosinase inhibitory assay	24
3.4.4 การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method	26
3.4.5 การหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation	27
3.4.6 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย UHPLC-UV-MS	28
3.4.7 การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลง	30
3.4.7.1 การศึกษา system suitability	31
3.4.7.2 การศึกษา method validation	31
3.4.8 การวิเคราะห์การหาปริมาณ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลง	32
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	34
4.1 การเตรียมสารสกัดจากดอกพญากาหลง	34

4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	34
4.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging assay	34
4.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay	37
4.2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay)	40
4.3 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay	41
4.4 การศึกษาหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method	44
4.5 การศึกษาหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation .	45
4.6 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย UHPLC-UV-MS	46
4.7 การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญา กาหลง	49
4.7.1 การศึกษา system suitability	49
4.7.2 การศึกษา method validation	50
4.7.2.1 Specificity	50
4.7.2.2 Linearity	53
4.7.2.3 Accuracy	53
4.7.2.4 Intra-day precision (repeatability)	55
4.7.2.5 Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)	56
4.8 การวิเคราะห์การหาปริมาณ rutin ในสารสกัดจากดอกพญา กาหลง	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	59
บรรณานุกรม	65
ภาคผนวก	68
ประวัติผู้เขียน	73



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารที่เกี่ยวข้อง (Li et al., 2009).....	6
ตาราง 2 การใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging assay	21
ตาราง 3 การใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay	22
ตาราง 4 การใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assay	24
ตาราง 5 ตารางการใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	25
ตาราง 6 การใส่สารลงใน centrifuge tube เพื่อหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method.....	27
ตาราง 7 การใส่สารลงใน centrifuge tube เพื่อหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์วิธี aluminium chloride complexation	28
ตาราง 8 ระบบ UHPLC-UV-MS และ gradient elution	29
ตาราง 9 ระบบ UHPLC-UV และ gradient elution ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา	31
ตาราง 10 น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสารสกัด และผล % yield crude extract สารสกัดจากดอกพญา กาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV).....	34
ตาราง 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน rutin (n=3) ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay	35
ตาราง 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay	35
ตาราง 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay	35

ตาราง 14 สรุปค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay.....	36
ตาราง 15 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน rutin (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay	37
ตาราง 16 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay	38
ตาราง 17 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay	38
ตาราง 18 สรุปค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) สารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay.....	38
ตาราง 19 แสดงความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน ferrous sulfate	40
ตาราง 20 แสดงฤทธิ์ Ferrous sulfate equivalent (mmol/100g extract) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay)	41
ตาราง 21 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ kojic acid (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay	41
ตาราง 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay	42
ตาราง 23 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay.....	42
ตาราง 24 สรุปค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay.....	42
ตาราง 25 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid.....	44
ตาราง 26 ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV).....	45

ตาราง 27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน quercetin	46
ตาราง 28 ปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)	46
ตาราง 29 แสดงผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย UHPLC-UV-MS ของสารมาตรฐาน gallic acid, chlorogenic acid Ideain, chloride, ellagic acid, rutin, isoquercetin, quercetin และสารตัวอย่างสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)	47
ตาราง 30 แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ system suitability ในสภาวะ water : acetonitrile ในสัดส่วน 0-5 min, 15% acetonitrile; 5-6 min, 27.5-100% acetonitrile และ 6.01-7 min, 100-15% acetonitrile ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) ความเข้มข้น 0.1 mg/mL (n=6) 50	
ตาราง 31 แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ system suitability ในสภาวะ water : acetonitrile ในสัดส่วน 0-5 min, 15% acetonitrile; 5-6 min, 27.5-100% acetonitrile และ 6.01-7 min, 100-15% acetonitrile ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) 0.1 mg/mL (n=6)	50
ตาราง 32 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ให้ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง, สมการเส้นตรง และค่า correlation coefficient (n = 3)	53
ตาราง 33 การศึกษา Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ในสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW).....	54
ตาราง 34 การศึกษา Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ในสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV)	54
ตาราง 35 การศึกษา Intra-day precision ของวิธีวิเคราะห์ ของดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) 55	
ตาราง 36 การศึกษา Intra-day precision ของวิธีวิเคราะห์ ของดอกพญากาหลงสีม่วง	55
ตาราง 37 แสดงสมการเส้นตรง, ค่า correlation coefficient, LOD, LOQ ของสารมาตรฐาน rutin	55
ตาราง 38 แสดง สมการเส้นตรง และค่า correlation coefficient ของสารมาตรฐาน rutin.....	57
ตาราง 39 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในตัวอย่างสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW)	58
ตาราง 40 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในตัวอย่างสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV)	58

ตาราง 41 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารมาตรฐาน rutin สกัด ดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3)	60
ตาราง 42 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสกัดดอกพญา กาหลงสีม่วง (BV) (n=3)	61
ตาราง 43 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay	69
ตาราง 44 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay	69
ตาราง 45 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay). 70	
ตาราง 46 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay	70
ตาราง 47 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method	71
ตาราง 48 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation	71
ตาราง 49 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของการวิเคราะห์การหาปริมาณ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)	72

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพญากาหลง	5
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของสารที่เกี่ยวข้อง	6
ภาพประกอบ 3 แสดงกระบวนการเกิดเมลานิน	12
ภาพประกอบ 4 หลักการของ high performance liquid chromatography (HPLC)	13
ภาพประกอบ 5 หลักการของ mass spectrometry	14
ภาพประกอบ 6 เกณฑ์การยอมรับ %recovery	16
ภาพประกอบ 7 เกณฑ์การยอมรับ %RSD	17
ภาพประกอบ 8 สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)	34
ภาพประกอบ 9 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH Scavenging assay ของสารมาตรฐาน rutin	36
ภาพประกอบ 10 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH Scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW)	36
ภาพประกอบ 11 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH Scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV)	37
ภาพประกอบ 12 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging assay ของสารมาตรฐาน rutin	39
ภาพประกอบ 13 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW)	39
ภาพประกอบ 14 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV)	39
ภาพประกอบ 16 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน kojic acid (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay	43

ภาพประกอบ 17 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay..	43
ภาพประกอบ 18 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay	44
ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน gallic acid	45
ภาพประกอบ 20 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน quercetin	46
ภาพประกอบ 21 กราฟมาตรฐาน retention time และ signal (mAU) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)	48
ภาพประกอบ 22 Mass spectrum ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)	49
ภาพประกอบ 23 แสดง UHPLC chromatogram ของตัวทำละลาย (diluent)	51
ภาพประกอบ 24 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานผสมของ rutin, isoquercetin และ quercetin ที่ความเข้มข้น 0.04 mg/mL	51
ภาพประกอบ 25 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ rutin ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/mL	51
ภาพประกอบ 26 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ isoquercetin ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL	52
ภาพประกอบ 27 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ quercetin ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL	52
ภาพประกอบ 28 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง <i>Bauhinia tomentosa</i> L.	52
ภาพประกอบ 29 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีม่วง <i>Bauhinia tomentosa</i> L.....	52
ภาพประกอบ 30 calibration curve ของสารมาตรฐาน rutin (n=3)	53

ภาพประกอบ 31 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ rutin ความเข้มข้น 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 56

ภาพประกอบ 32 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ rutin ความเข้มข้น 0.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 56



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

ปัจจุบันการนำสารสกัดจากสมุนไพรในธรรมชาติเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและความงามกำลังเป็นที่ต้องการและมีรายงานการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยในคนและสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้นโดยการนำพืชสมุนไพรท้องถิ่นของประเทศไทยมาใช้พัฒนาเป็นยาและเครื่องสำอางช่วยส่งเสริมการเพิ่มมูลค่าของพืชท้องถิ่น (Ribeiro et al., 2015) ช่วยลดการนำเข้ายาและเครื่องสำอางจากต่างประเทศ ช่วยส่งเสริมให้เกษตรกรมีรายได้ และส่งเสริมผู้ประกอบการให้มีแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีจุดเด่นทางการตลาด (Kwankhao et al., 2020) พืชสมุนไพร ของประเทศไทยที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอางมีกระบวนการฟื้นฟูสุขภาพของผิว ด้วยกลไกต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ สมานบาดแผล ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส อิลาสเทส ไทโรซิเนส ปกป้องเซลล์จากแสงยูวี รักษาโรคผื่นภูมิแพ้ทางผิวหนัง (Chaikhong et al., 2023) พืชสมุนไพรหลายชนิดที่พัฒนาเป็นเครื่องสำอาง เช่น สารสกัดจากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.), ใบชะคราม (*Suaeda maritima* (L.)) ใบบัวบก (*Centella asiatica*), ทับทิม (*Punica granatum* L.), ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.), มะขาม (*Tamarindus indica* L.), กล้วยชัน (*Clitoria ternatea* L.), มะลิ (*Jasminum* spp.) และ กุหลาบ (*Rosa* spp.) เป็นต้น สารสำคัญในสารสกัดจากธรรมชาติที่มีสรรพคุณในทางเครื่องสำอางส่วนใหญ่ เป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol compounds) เช่น สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติ เช่น รักษาบาดแผล ต้านการอักเสบ เสริมภูมิคุ้มกัน ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Manach et al., 2004) สารประกอบฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติ เช่น ดูดซับแสงยูวี การต้านอนุมูลอิสระ การจับกับโลหะ การต้านการอักเสบ การจับกับตัวรับเอสโตรเจน การปกป้องระบบหัวใจ และหลอดเลือด การต้านเชื้อจุลชีพ (Patel & Patel, 2019) โดยสารสำคัญที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง เช่น arbutin, kojic acid, quercetin, rutin, kaempferol, gallic acid (Chatatikun et al., 2023)

พืชในตระกูล *Bauhinia* spp. เป็นพืชดอกที่มีหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Bauhinia acroana* Harms, *Bauhinia aculeata* L., *Bauhinia acuminata* L., *Bauhinia acuruana* Moric., *Bauhinia affinis* Vogel, *Bauhinia albicans* Vogel, *Bauhinia amambayensis* Fortunato เป็นต้น โดยเป็นแหล่งของสารสำคัญในกลุ่มโพลีฟีนอล (Thetsana, Palanuvej and Ruangrunsi, no date) มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดไขมัน ต้านมะเร็ง (Thetsana et al.)

พญาภาหลง (*Bauhinia tomentosa* L.) เป็นพืชไม้ดอกไม้ประดับที่พบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อยู่ในวงศ์ Leguminosae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก แตกกิ่งก้านออกเป็นพุ่มทึบ ใบดก ดอกจะออกเป็นช่อสั้น ๆ มีสีเหลืองในช่วงเช้า เมื่อโดนแสงแดดจะค่อย ๆ เปลี่ยนสีเป็นสีม่วงและร่วงโรยในช่วงเย็น ดอกจะมีอายุ 1-2 วัน พญาภาหลงออกดอกตลอดทั้งปี คล้ายกับดอกพุทตาน (*Hibiscus mutabilis*) จะมีสีขาวในช่วงเช้าจะค่อย ๆ เปลี่ยนสีเป็นสีชมพูในช่วงบ่าย และเป็นสีแดงในช่วงเย็นถึงค่ำ จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีพบว่าดอกสีแดงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าดอกสีขาวและสีชมพู (Wong et al., 2009) สารสำคัญที่พบในสารสกัดพญาภาหลงรวมไปถึงสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่พบเช่น quercetin, rutin และ isoquercetin (ภาพประกอบ 1) (Nallabattini et al., 2014) สารสำคัญที่พบในสารสกัดพญาภาหลง ได้แก่ สารในกลุ่ม flavonoids ที่พบเช่น quercetin, rutin และ isoquercetin (Nallabattini et al., 2014) ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ที่น่าสนใจของสารสกัดจากดอกพญาภาหลง จากการศึกษาแบบ *in vivo* พบฤทธิ์ทางชีวภาพของพญาภาหลงได้แก่ ฤทธิ์ต้านอาการปวดในหนู mice โดยพบในสารสกัดจากราก, ฤทธิ์ลดอาการวิตกกังวลในสัตว์ทดลองโดยพบในสารสกัดจากใบ, ฤทธิ์ anticatatonic พบในสารสกัดจากใบ โดยทดสอบในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด catalepsy ด้วย haloperidol, ฤทธิ์ต้านอาการซึมเศร้าในสัตว์ทดลองพบในสารสกัดจากใบ, ฤทธิ์ต้านเบาหวานพบในสารสกัด จากดอก โดยทดสอบในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วย streptozotocin และฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือดพบในสารสกัดจากดอกโดยทดสอบในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วย streptozotocin เป็นต้น (Nallabattini et al., 2014)

จะเห็นว่าพญาภาหลงเป็นสมุนไพรที่เป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีประโยชน์ ทางเภสัชวิทยา การพัฒนาพญาภาหลงให้เป็นสารสกัดที่นำไปประโยชน์ในทางยาและเครื่องสำอาง จำเป็นต้องศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ และวิธีการควบคุมคุณภาพของสารสำคัญให้มีความสม่ำเสมอ มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสำหรับการใช้งาน งานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกพญาภาหลงสีเหลืองและสีม่วง และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสำคัญของสารสกัดให้มีความสม่ำเสมอ เพื่อเป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากดอกพญาภาหลงมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อใช้ในการส่งเสริมด้านสุขภาพและความงาม

1.2 ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้มุ่งหมายไว้ดังต่อไปนี้

1. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณรวมของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง
2. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง
3. เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงด้วยเทคนิค UHPLC-UV-MS
4. เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดจากดอกพญากาหลงด้วยเครื่อง UHPLC-UV ตาม AOAC guideline

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง เพื่อใช้เป็นแนวทางเพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวอย่างสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงในจังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย ที่สกัดด้วย 80%เอทานอล
2. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และครอบคลุมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay
3. เครื่องมือที่ทำการศึกษาคือองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ UHPLC-UV-MS

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หมายถึงความสามารถของสารที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระหรือจับกับตัวรับและยับยั้งปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องเนื่องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่งได้

Mushroom tyrosinase inhibitory assay หมายถึงการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากการยับยั้งการเกิด dopachrome ด้วยเทคนิค spectrophotometry

%Inhibition หมายถึง ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งวัดผลจาก

ค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ณ ความยาวคลื่นที่เหมาะสม จากนั้นคำนวณโดยใช้สมการ

The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) หมายถึง ประสิทธิภาพของสารทดสอบในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบได้ร้อยละ 50 โดยคำนวณได้จากสมการที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบและร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในช่วง 0-100

1.6 สมมติฐานงานวิจัย

1. สารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลืองและสีม่วงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกัน
2. สารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลืองและสีม่วงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่างกัน
3. สารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลืองและสีม่วงมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

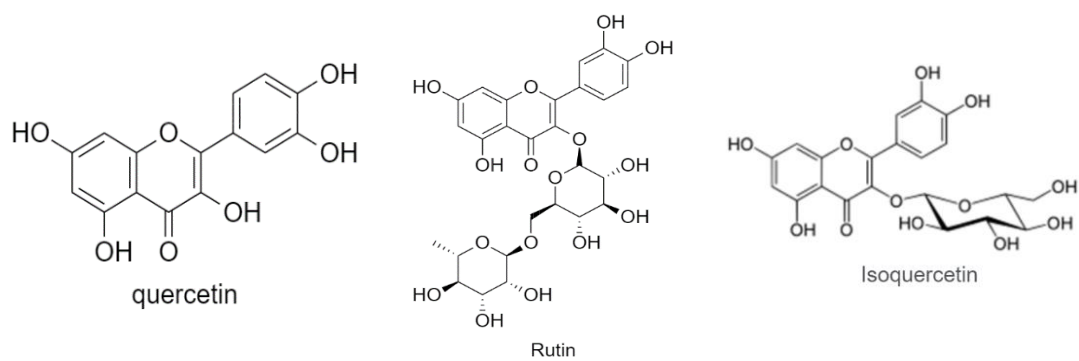
2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของพญากาหลง

พญากาหลง (*Bauhinia tomentosa* L.) เป็นพืชไม้ดอกไม้ประดับที่พบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อยู่ในวงศ์ Leguminosae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก แตกกิ่งก้านออกเป็นพุ่มทึบ ใบดก ดอกจะออกเป็นช่อสั้น ๆ มีสีเหลืองอ่อนในช่วงเช้า เมื่อโดนแสงแดดจะค่อย ๆ เปลี่ยนสีเป็นสีม่วงและร่วงโรยในช่วงเย็นหรือเช้าวันถัดไป ดอกจะมีอายุ 1-2 วัน พญากาหลงออกดอกตลอดทั้งปี คล้ายกับดอกพุทตาน (*Hibiscus mutabilis*) จะมีสีขาวในช่วงเช้า จะค่อย ๆ เปลี่ยนสีเป็นสีชมพูในช่วงบ่าย และเป็นสีแดงในช่วงเย็นถึงค่ำ จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีพบว่าดอกสีแดงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าดอกสีขาวและสีชมพู (Wong et al., 2009) สารสำคัญที่พบในสารสกัดพญากาหลง ได้แก่ รวมไปถึงสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่พบเช่น quercetin, rutin และ isoquercetin (ภาพประกอบ 1) (Nallabattini et al., 2014)

คุณสมบัติทางเคมีกายของ rutin, isoquercetin และ quercetin มีมวลโมเลกุล 610.52, 464.4 และ 302.23 ตามลำดับ สารทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถละลายได้ใน methanol โดย rutin มีขั้วมากที่สุด รองลงมาคือ isoquercetin และ quercetin ตามลำดับ rutin, isoquercetin และ quercetin มีความเป็นกรดอ่อน มีค่า pKa ประมาณ 6.4 และมีการดูดกลืนรังสียูวีอยู่ที่ประมาณ 359 นาโนเมตร (ตารางที่ 1) (Li et al., 2009)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพญากาหลง



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของสารที่เกี่ยวข้อง

ที่มา: (Wikipedia, 2024a, 2024b, 2024c)

ตาราง 1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารที่เกี่ยวข้อง (Li et al., 2009)

สารสำคัญ	Rutin	Isoquercetin	Quercetin
MW	610.52	464.4	302.23
Log P	-2.02	0.7	1.48
การละลาย	ละลายใน methanol, pyridine, alkaline solution, และ น้ำร้อน	ละลายใน ether, methanol, ethanol, acetone, pyridine, acetic acid ไม่ละลายในน้ำ	ละลายใน ether, methanol, ethanol, acetone, pyridine, acetic acid ไม่ละลายในน้ำ
pKa	6.37 และ 7.96	6.37	6.41 และ 7.81
ความคงตัว	สารสลายตัวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 140°C	ไม่คงตัวในอากาศและแสง	ไม่คงตัวในอากาศและแสง
λ_{max}	257, 359 nm	257, 369 nm	256, 301, 373 nm

2.2 การสกัดสารจากพญากาหลง

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าสารสกัดของพญากาหลงที่สกัดด้วย 50% ethanol และนำไปทำ fraction ด้วย ethyl acetate และ butanol พบสารในกลุ่ม flavonol ได้แก่ kaempferol-7-O-rhamnoside, kaempferol-3-O-glucoside (astragaloside), quercetin-3-O-glucoside (isoquercetin) และ quercetin-3-O-rutinoside (rutin)

Rutin เป็นสารในกลุ่ม flavonoids กลุ่ม flavonol ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนส จากการทบทวนวรรณกรรมการเปลี่ยนสีของดอกพุดตานพบว่าการเปลี่ยนแปลงสีของดอกจากสีขาวเป็นแดงเกิดจากการสังเคราะห์ anthocyanin สารในกลุ่ม anthocyanin มีความไม่คงตัวไวต่อ pH แสง อุณหภูมิ ไซลไฟท์ ออกซิเจน เอนไซม์และ co-pigmentation สำหรับ pH เท่ากับ 1 สารกลุ่มนี้จะมีสีแดงหรือม่วงและละลายน้ำได้ดีโดยมีโครงสร้างเป็น flavylium cation เมื่อ pH เท่ากับ 2-4 สารจะมีสีฟ้า เมื่อ pH เท่ากับ 5-6 สารจะไม่สี และเมื่อ pH มากกว่า 7 สารจะเกิดการสลายตัว (Enaru & Pop, 2021) สารสกัดที่นำมาใช้ในการทดสอบในการศึกษานี้มีอายุมากกว่า 6 เดือนจึงเป็นไปได้ที่สารในกลุ่มนี้จะเกิดการสลายตัวทำให้ตรวจสอบไม่พบด้วยเทคนิค UHPLC-UV-MS

2.3 พฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพญากาหลง

สารสกัดจากพญากาหลงพบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจจากการศึกษาแบบ in vivo พบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่

1. ฤทธิ์ต้านอาการปวดในหนู mice โดยพบในสารสกัดจากราก (Nallabattini et al., 2014)
2. ฤทธิ์ลดอาการวิตกกังวลในสัตว์ทดลองโดยพบในสารสกัดจากใบ (Nallabattini et al., 2014)
3. ฤทธิ์ anticatatonic พบในสารสกัดจากใบ โดยทดสอบในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด catalepsy ด้วย haloperidol (Nallabattini et al., 2014)
4. ฤทธิ์ต้านอาการซึมเศร้าในสัตว์ทดลองพบในสารสกัดจากใบ (Nallabattini et al., 2014)
5. ฤทธิ์ต้านเบาหวานพบในสารสกัดจากดอก โดยทดสอบในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วย streptozotocin (Nallabattini et al., 2014)
6. ฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือดพบในสารสกัดจากดอกโดยทดสอบในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วย streptozotocin (Nallabattini et al., 2014)

2.4 สารกลุ่มฟีนอลิกและการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก จัดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พืชสร้างขึ้นและพบได้มากในธรรมชาติ โดยในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ ซึ่งสารประกอบฟีนอล (phenol) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่และสารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอลที่ต่ออยู่กับกรดคาร์บอกซิลิก (-COOH group) รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ลิกนิน (lignins) กรดซินนามิก (cinnamic acid) ซึ่งการจำแนกสารประกอบฟีนอลิก สามารถจำแนกออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

1.กลุ่มกรดฟีนอลิก สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็นโครงสร้างของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) และกลุ่มที่เป็นโครงสร้างของกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) ได้แก่ กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) และกรดคูมาริก (coumaric acid) (Agustin-Salazar et al., 2014)

2.กลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มใหญ่ สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่มตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันประกอบด้วยกลุ่ม ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาวาโนนอล (flavanonols) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) (Agustin-Salazar et al., 2014)

3.กลุ่มสตีลบีเนส (stilbenes) ในธรรมชาติจะถูกสร้างขึ้นโดยพืชเพื่อป้องกันเชื้อโรครวมไปถึงแมลง และสามารถป้องกันแสงแดด จากการศึกษพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและต้านการอักเสบได้ (Agustin-Salazar et al., 2014)

4.กลุ่มคูมารินส์ (coumarins) สามารถแบ่งโครงสร้างออกได้เป็น 4 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างดังนี้ คูมารินอย่างง่าย (simple coumarins) ฟูแรนคูมาริน (furanocoumarins) ไพแรนคูมาริน (pyranocoumarins) และคูมารินที่ถูกแทนที่ด้วยไพโรน (pyrone-substituted coumarins) (Agustin-Salazar et al., 2014)

5.กลุ่มแทนนินส์ (tannins) สามารถแบ่งตามโครงสร้างออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ condensed tannins เป็นสารที่ไม่ถูกย่อยแต่เมื่อถูกกรดหรือเอนไซม์จะสลายให้สารสีแดงซึ่งไม่ละลายน้ำ และอีกกลุ่มคือ hydrolysable tannins เช่น gallic acid หรือ ellagic acid จับกันเป็น

โมเลกุลใหญ่เป็นสารที่ถูกละลาย (hydrolyse) ได้โดยกรดหรือเอนไซม์ (Agustin-Salazar et al., 2014)

ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบของเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งรวมไปถึงเอนไซม์ไฮยาไลติคเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส คุณสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยใช้หลักการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือ UV-Vis spectrophotometer ซึ่งเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ให้สีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายกับสารทดสอบ Folin-Ciocalteu reagent ที่ประกอบไปด้วยโซเดียมโมลิบเดต (sodium molybdate) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) และโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) โดยพบว่าสารจากธรรมชาติที่มีกลุ่มฟีนอลิกไฮดรอกซิล (phenolic hydroxyl group) หรือสารกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) เป็นองค์ประกอบ จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับสารทดสอบ Folin-Ciocalte reagent ซึ่งมีสีเหลืองให้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น phosphotungstic acid และ phosphomolybdate ซึ่งมีสีน้ำเงิน และนำไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารตัวอย่างนั้น คำนวณโดยใช้การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารตัวอย่างจากสมการของกราฟมาตรฐานเพื่อรายงานค่าในหน่วย Gallic acid equivalents (GAE) (Agustin-Salazar et al., 2014)

2.5 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในพืช โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นฟลาแวน (flavan) หรือ 2-ฟีนอลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันแบบ C-C-C เรียงเป็น 3 ring เรียกเป็น ring A, B, และ C โดย ring A และ B เป็นวงเบนซีน (benzene ring) ส่วน ring C เป็น heterocyclic pyran ring ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง ทำให้โครงสร้างที่ได้เป็นแบบวงแหวนโครแมน (chroman ring) ในธรรมชาติสารประกอบฟลาโวนอยด์มีมากกว่า 4,000 ชนิด ส่วนใหญ่ อยู่ในรูปฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่ หรือมากกว่าโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ จะเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) แรมโนส (rhamnose) อราบิโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) สารประกอบฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ใน โครงสร้างพื้นฐานได้เป็น 7 กลุ่ม

1. ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เควอซีติน (quercetin) แคมป์เฟอรอล (kaempferol) ไมริซิน (myricetin)
2. ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูทีโอลิน (luteolin) อาพิจินิน (apigenin)
3. ฟลาวานอน (flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (hesperetin)
4. ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทีชิน (catechin) แกลโลแคทีชิน (gallocatechin)
5. ฟลาวานอนอล (flavanonols) เช่น แทกซิโฟลิน (taxitulin)
6. ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เช่น เดดซีน (daidzein) จินิสเติน (genistein)
7. แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เช่น ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) มาลวิดิน (malvidin) เพลาโกนิดิน (pelargonidin) (Patel & Patel, 2019)

การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method โดยใช้เควอซีติน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน โดยหลักการคือ aluminium chloride (AlCl_3) จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คีโต (keto group) ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และหมู่ไฮดรอกซิลในคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 5 ของฟลาโวนและฟลาโวนอลหรือทำปฏิกิริยากับไดไฮดรอกซิล (dihydroxyl) ที่วงแหวน A และ B เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลือง โดยจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรหลังจากการเข้าทำปฏิกิริยาผ่านไปแล้ว 40 นาที จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายเควอซีติน เพื่อนำสมการไปคำนวณหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารละลายตัวอย่าง (Agustin-Salazar et al., 2014)

2.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ หมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ โรคชรา โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคที่เกิดจากความผิดปกติของปอด และระบบประสาท โรคที่เกี่ยวข้องกับสายตา เป็นต้น ธรรมชาติหรือร่างกายของสิ่งมีชีวิตจึงมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ เช่น การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การดักจับอนุมูลอิสระ การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การเสริมฤทธิ์และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ ทั้งนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและปริมาณมีหลายวิธีด้วยกัน แต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน ปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและ

สรุปผลทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพที่นิยม ได้แก่ การทำให้เกิดสีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ส่วนวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay) การฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS assay) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) วิธีที่ได้นำเสนอในบทความนี้ถือได้ว่าเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด

2.7 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส มีหน้าที่สร้างเม็ดสีให้ผิวหนัง ผง และตา เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดสีหมองคล้ำ โครงสร้างของผิวหนังแบ่งเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า ชั้นหนังแท้ และชั้นรองรับผิวหนัง

1.ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) เป็นผิวหนังชั้นนอกสุด มีเซลล์ที่สำคัญ 3 ชนิด คือ Melanocytes ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีหรือเมลานิน ซึ่งช่วยปกป้องผิวจากแสงแดด Langerhan's cells คล้าย macrophage ซึ่งมีหน้าที่หรือบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง และ Merkel cells ทำหน้าที่เป็นเซลล์ประสาทในชั้นหนังกำพร้า

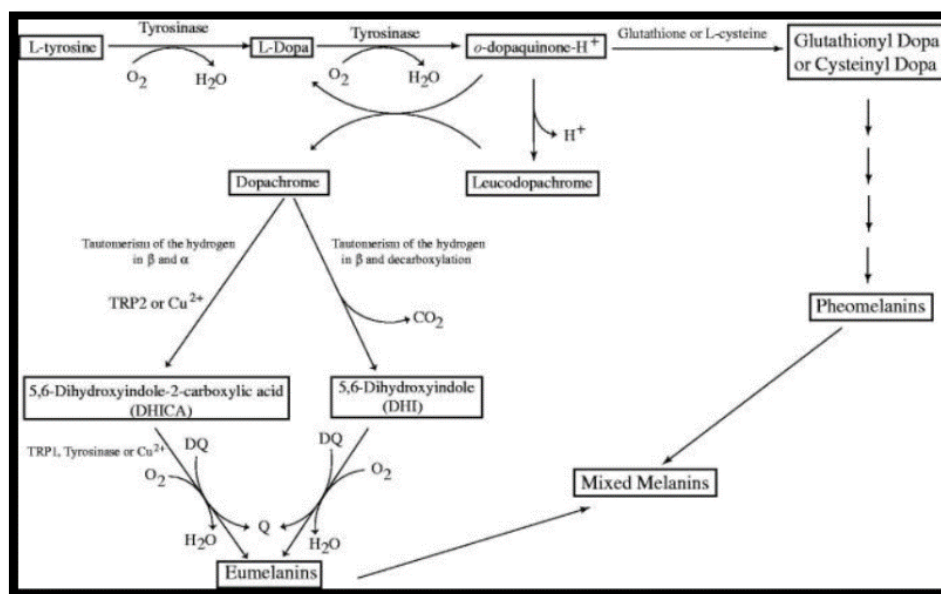
2.ชั้นหนังแท้ (Dermis) ผิวหนังชั้นนี้ประกอบด้วย หลอดน้ำเหลือง หลอดเลือด เส้นประสาท รากขนหรือผม ต่อมเหงื่อ ต่อมกลิ่น และกลุ่มเนื้อเยื่อจำนวนมาก มีบทบาทเกี่ยวกับการแพ้วรวมถึงการอักเสบของผิวหนัง

3.ชั้นรองรับผิวหนัง (Subcutaneous) ผิวหนังชั้นนี้ประกอบด้วย เนื้อเยื่อไขมันซึ่ง

ช่วยป้องกันอวัยวะภายในจาก การถูกกระแทก และเป็นที่สะสมไขมันในร่างกาย

ส่วนที่เป็นตัวกำหนดสีผิวคือเมลานินซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ในชั้นหนังกำพร้าโดยกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยเกิดจากเซลล์สร้างเม็ดสีหรือ Melanocyte ที่พบที่ชั้นล่างสุดของชั้นหนังกำพร้า จะสร้างและหลั่ง Melanosome ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์น้ำตาล (Brown organelles) ที่ภายในประกอบด้วยเอนไซม์ออกซิเดสที่ชื่อว่า ไทโรซิเนส มีคอปเปอร์อยู่ในโมเลกุล (Copper containing enzyme) เอนไซม์นี้เป็นตัวสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยสามารถเร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโน Tyrosine ในผิวหนังให้เป็น Dopa ซึ่งจะถูกละลายต่อไปเป็น Dopakinone โดย ปฏิกิริยา Hydroxylation และ Oxidation ตามลำดับ ตามด้วยการเปลี่ยน Dopakinone ผ่าน Intermediate อีกหลายตัว จากนั้นเกิด Polymerization ได้เป็นเมลานินซึ่งปรากฏให้เห็นเป็นสีผิวขึ้น เมลานินที่สร้างขึ้นที่ผิวหนังมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลเรียกว่า eumelanin ซึ่งเป็น

กลุ่มเม็ดสีที่มี ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและไม่ละลายน้ำ (Insoluble nitrogenous) โดย eumelanin มีองค์ประกอบหลักคือ 5,6- dihydroxyindole ส่วนชนิดมีสีเหลืองหรือสีส้มเรียกว่า pheomelanin (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 แสดงกระบวนการเกิดเมลานิน

ที่มา : (Samaneh Z. et al., 2019)

กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร สามารถแบ่งได้หลายแบบ ดังนี้

1.สารกำจัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Specific tyrosinase inactivators หรือเรียกว่า suicide substrates) สารนี้ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสเสียสภาพและไม่สามารถกลับไปทำงานได้เพราะจะทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ไทโรซิเนส

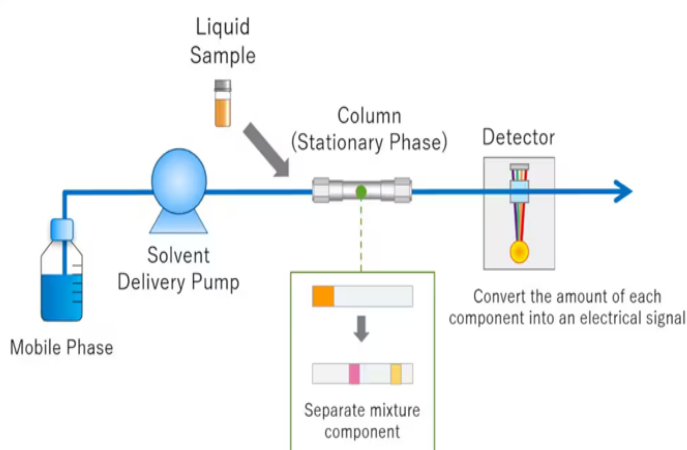
2.สารที่มีความจำเพาะในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Specific tyrosinase inhibitor) ได้แก่ สารประกอบที่ลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสามารถจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบผกผันกลับได้

กลุ่มสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ สารกลุ่มฟีนอลิก (Samaneh Z. et al., 2019) เช่น arbutin อนุพันธ์ kojic acid และอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีควิโนนาอิก มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DOPA ที่เกิดจากการถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงมีประสิทธิภาพในการลดการผลิตเม็ดสีผิวที่ผิวหน้ามากเกินไปได้ arbutin มีหลายรูปแบบ เช่น β -arbutin พบได้ในธรรมชาติ ส่วนชนิด α -arbutin ได้มาจากการสังเคราะห์ ซึ่ง α -arbutin มี

ประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า β -arbutin ประมาณ 20 เท่า เนื่องมาจากการมีโครงสร้างที่ถูก hydrolyze ด้วยเซลล์ ได้ง่ายกว่า นอกจากนี้มีการสังเคราะห์ deoxyarbutin ขึ้นเพื่อขจัดหมู่ OH ออกจากโครงสร้าง จึงช่วยทำให้มีความสามารถซึมสูผิวได้ดี kojic acid พบในราสกุล Aspergillus และ Penicillium มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยทำหน้าที่เป็น chelating agent จับกับ Cu^{2+} บริเวณตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอล (Samaneh Z. et al., 2019) เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มักพบในดอกไม้สี ตัวอย่างสารประกอบโพลีฟีนอลได้แก่ quercetin, rutin, myricetin, kaempferol, nobiletin, norartocarpetin, hagininn A, isoliquiritin, licochalcone A, kuraridin, hesperetin, dihydromorin, artocarpetin, kurarinol และ resveratrol เป็นต้น

2.8 หลักการของ high performance liquid chromatography (HPLC) และ mass spectrometry (Liu et al., 2017)

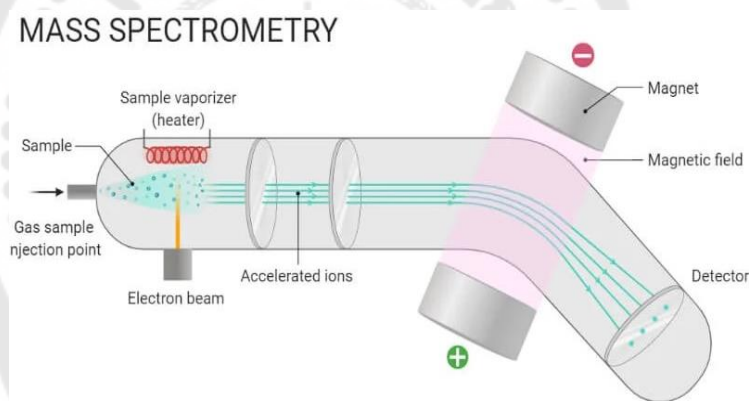
หลักการของ HPLC คือ การแยกสารโดยเป็นการพาสารตัวอย่างเข้า column หรือ stationary phase ด้วย mobile phase สารแต่ละชนิดจะถูกแยกตามความสามารถในการจับกับ stationary phase หากสารที่มีความชอบจับกับ stationary phase มากจะถูกหน่วงอยู่ใน column ได้นาน จะมีผลต่อค่า retention time ที่มากกว่าสารที่มีความชอบจับกับ stationary phase น้อยซึ่งจะถูกพาออกมาได้ไวกว่า



ภาพประกอบ 4 หลักการของ high performance liquid chromatography (HPLC)

ที่มา : (Shimadzu, 2024)

หลักการของ mass spectrometer ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลของสารตัวอย่างแตกออกเป็นไอออน และแยกไอออน เหล่านั้นออกตาม mass to charge ratio หรือตามค่าประจุต่อมวล ขั้นตอนการทำงานมีดังนี้ เริ่มจากการทำให้สารตัวอย่างเป็นแก๊ส จากนั้นทำให้แก๊สของสารตัวอย่างแตกออกเป็นไอออน จากนั้นแยกไอออน ออกตามค่า mass to charge ratio และแต่ละไอออนจะถูกนับด้วย detector โดยมี mode of detection ได้แก่ full scan mode และ SIM mode ที่ทำงานต่างกันโดย full scan mode จะตรวจวัดความเข้มของสัญญาณของมวลโมเลกุลของสารเป็นช่วงของค่ามวลโมเลกุลที่ตั้งในโปรแกรมมีข้อดี คือสามารถตรวจวัดความเข้มของสัญญาณของมวลโมเลกุลของสารทุกตัวที่อยู่ในช่วงของค่ามวลโมเลกุลที่ตั้งไว้ที่พบในสารที่นำมาวิเคราะห์ แต่มีข้อเสียคือทำให้ได้ค่า ความเข้มของสัญญาณ ของแต่ละมวลโมเลกุลน้อยกว่า SIM mode เนื่องจากเป็นการเปิดหน้าต่างรับทุกมวลโมเลกุล ในขณะที่ SIM mode จะทำการรับเพียงมวลโมเลกุล ที่กำหนดเท่านั้น จะมีข้อดีคือจะได้ค่าความเข้มของสัญญาณที่สูงกว่า full scan mode



ภาพประกอบ 5 หลักการของ mass spectrometry

ที่มา: (BioRender.com, 2024)

2.9 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) (AOAC, 2016)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการขึ้นทะเบียนตำรับยา การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร การตรวจวัดระดับยาในชีวสาร เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับวิธีวิเคราะห์สารที่ต้องการได้ ซึ่งการทำ method validation จะใช้ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ผู้วิเคราะห์พัฒนาขึ้นเองหรือดัดแปลงมาจากวิธีอ้างอิง ซึ่งจำเป็นต้องทำ method validation เพื่อทดสอบว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำและยอมรับได้

แนวทางการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สำหรับการขึ้นทะเบียนตำรับยาโดยอ้างอิงตามมาตรฐาน AOAC guidelines ซึ่งมีพารามิเตอร์ที่ใช้สำหรับการทดสอบ ได้แก่ specificity (ความจำเพาะ) , linearity (ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง), accuracy (ความถูกต้อง), precision (ความแม่นยำ), limit of detection (LOD) หรือปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้และ limit of quantitation (LOQ) หรือ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. Specificity (ความจำเพาะ) เป็นความสามารถในการแยกความแตกต่างระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์กับสารอื่น (discrimination) โดยวิธีควรจำเพาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์และปราศจากการรบกวนจากสารอื่น เช่น impurities, degradation, product, matrix หรือ excipients ต้องสามารถแยกตัวยาสำคัญออกจากสารละลายตัว เพื่อไม่ให้สารละลายตัวมารบกวนการวิเคราะห์

2. Linearity (ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง) เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตรวจสอบโดยการสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลวิเคราะห์และความเข้มข้นต่าง ๆ กันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้นในช่วง 50-150% ของความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งค่า linearity สามารถแสดงด้วยค่า correlation coefficient (r), slope (a), และ y-intercept (b) ของสมการเส้นตรง $y = ax + b$ เกณฑ์การยอมรับของ linearity โดยทั่วไปการวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีในตำรับยากำหนดค่า correlation coefficient (r) ไม่น้อยกว่า 0.9995

3. Accuracy (ความถูกต้อง) เป็นการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ (result value) กับค่าที่แท้จริง (true value) สามารถตรวจสอบได้โดยเติม (spike) สารมาตรฐานลงในตัวทำละลายในช่วงความเข้มข้น 50-150% ของปริมาณที่คาดว่าจะมีอยู่จริง ความถูกต้องพิจารณาจากปริมาณตัวยาที่พบ (found amount) กับปริมาณตัวสารมาตรฐานที่เติม (added amount) ซึ่งคำนวณจาก %recovery หาก %recovery มีค่าเท่ากับ 100 หมายความว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับปริมาณที่เติมลงไป ถ้า %recovery น้อยกว่า 100 หมายความว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าปริมาณที่เติม และถ้า %recovery มากกว่า 100 หมายความว่าปริมาณที่วิเคราะห์ได้มากกว่าปริมาณที่เติม โดยสรุปวิธีที่มีความถูกต้องควรมีค่า %recovery เข้าใกล้ 100 เกณฑ์การยอมรับขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารตัวอย่างโดยทั่วไปมีเกณฑ์การยอมรับดังนี้

Analyte (%)	Unit	Mean Recovery (%)
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0.1	0.1%	95-105
0.01	100 ppm	90-107
0.001	10 ppm	80-110
0.0001	1 ppm	80-110
0.00001	100 ppb	80-110
0.000001	10 ppb	60-115
0.0000001	1 ppb	40-120

Source: AOAC (2002). AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07, \AOAC\ieCam\Single-Lab_Validation_47.doc. http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf.

ภาพประกอบ 6 เกณฑ์การยอมรับ %recovery

ที่มา: (AOAC, 2016)

4. Precision (ความแม่นยำ) แสดงถึงความใกล้เคียงกันของค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำจากการวิเคราะห์ครบทุกขั้นตอน ค่าความแม่นยำดูได้จาก relative standard deviation (%RSD) หรือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ซึ่งวิธีการตรวจสอบความแม่นยำสามารถทำได้โดย

4.1 Repeatability เป็นการตรวจโดยนักวิเคราะห์คนเดียว เครื่องมือและสภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน และวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกันหรือวันเดียวกัน

4.2 Reproducibility เป็นการวิเคราะห์ซ้ำในห้องปฏิบัติการต่างกัน จึงใช้เครื่องมือ เทคนิคในการวิเคราะห์ สารเคมี และอุปกรณ์ที่มีความแตกต่างกัน โดยมีสูตรคำนวณ คือ

$$\%RSD = \frac{SD}{\text{mean}} \times 100$$

หากวิธีวิเคราะห์มี %RSD เท่ากับ 0 หมายความว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าเท่ากันทุกครั้ง โดยสรุป คือวิธีวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ %RSD ควรมีค่าเข้าใกล้ 0 ซึ่งเกณฑ์การยอมรับของ precision แตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของตัวยาสำคัญในตำรับ จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ สภาวะการวิเคราะห์ความคงตัวของสาร precision มีเกณฑ์การยอมรับดังนี้

Analyte (%)	Unit	RSD _r (%)	RSD _R (%)
100	100%	1	2
10	10%	1.5	3
1	1%	2	4
0.1	0.1%	3	6
0.01	100 ppm	4	8
0.001	10 ppm (µg/g)	6	11
0.0001	1 ppm	8	16
0.000001	10 ppb (µg/kg)	15	32

AOAC (2002). AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07, \AOAC\leCam\Single-Lab_Validation_47.doc.
http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf.

ภาพประกอบ 7 เกณฑ์การยอมรับ %RSD

ที่มา: (AOAC, 2016)

5. Limit of detection (LOD) หรือ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ คือปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างใด ๆ ที่สามารถตรวจพบได้ แต่ไม่จำเป็นต้องทราบว่ามีปริมาณที่แน่นอนเท่าใด วิธีการทดสอบค่า LOD จะใช้วิธีการคำนวณจาก SD และ slope ของ calibration curve ในช่วงความเข้มข้นต่ำ โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$LOQ = \frac{3.3SD}{\text{Slope}}$$

SD = standard deviation of y-intercepts

Slope = average slope from 3 equations

6. Limit of quantitation (LOQ) หรือ ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้ คือปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างที่สามารถตรวจหาเชิงปริมาณ โดยมีความเที่ยงและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม วิธีการทดสอบค่า LOQ จะใช้วิธีการคำนวณจาก SD และ slope ของ calibration curve ในช่วงความเข้มข้นต่ำ โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$LOQ = \frac{10SD}{\text{Slope}}$$

SD = standard deviation of y-intercepts

Slope = average slope from 3 equations

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ABTS หรือ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
2. Acetonitrile
3. Aluminium chloride
4. Chlorogenic acid
5. di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous
6. DMSO หรือ dimethyl sulfoxide
7. DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
8. Ellagic acid
9. Ethanol AR
10. Ferric chloride hexahydrate
11. Ferrous sulfate
12. Folin-ciocalteu reagent
13. Formic acid
14. Gallic acid
15. Glacial acetic acid
16. Hydrochloric Acid
17. Ideain chloride
18. Isoquercetin
19. Kojic acid
20. L-dopa
21. Methanol
22. Phosphoric acid
23. Potassium persulfate
24. Quercetin
25. Rutin
26. Sodium acetate trihydrate

27. Sodium carbonate
28. Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate
29. Sodium hydroxide
30. TPTZ หรือ 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
31. Trolox
32. Tyrosinase from mushroom
33. Ultrapure water

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 96-microwell plate
2. C18 column ขนาด 3 x 150 mm, 2.7 μ m
3. centrifuge tube ขนาด 15 mL และ 50 mL
4. Hot air oven
5. Micropipette ขนาด 2-20, 10-100, 100-1000 และ 1000-5000 μ L
6. Micropipette tips
7. Microplate reader
8. Nylon membrane filter 0.22 micron
9. Nylon syringe filter 0.22 micron
10. Rotary evaporator
11. Screw cap bottle
12. Syringe 1 mL
13. Ultrasonic bath
14. Vacuum pump
15. Vortex
16. Water bath
17. เครื่อง UHPLC-UV-MS
18. เครื่องแก้ว
19. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
20. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง
21. เครื่องผลิต ultrapure water

22. ชุดกรอง mobile phase

3.3 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงในจังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากดอกพญากาหลง

การเตรียมพืชและสารละลาย นำพืชที่ต้องการทดสอบ คือ ดอกพญากาหลง (สีเหลืองและสีม่วง) มาล้างในน้ำที่ร้อนจนแห้ง นำไปอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียด จากนั้นเตรียมสารละลาย 80% เอทานอลโดยผสม 95% เอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 84.21 : 15.19 เก็บในขวดแก้วสีชา

การสกัดสารสำคัญทำโดยนำพืชที่ต้องการทดสอบใส่ใน Erlenmeyer flask เติมสารละลาย 80% เอทานอลลงใน Flask ในอัตราส่วนผงพืช 1:20 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน เขย่าเป็นครั้งคราว กรองสารสกัดด้วยสำลีเพื่อให้ได้สารละลายใส และสกัดผงพืชซ้ำ 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยตั้งค่าเครื่องเป็น rotation 100 rpm, chiller 5 °C, water bath 45 °C และ vacuum 70-180 mbar จากนั้นเทสารสกัดที่ได้ใส่ evaporating dish นำมาระเหยต่อบน water bath จนสารสกัดข้นเหนียว เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดแก้ว และเก็บในโถแก้วดูความชื้นที่อุณหภูมิห้อง การหาปริมาณสารที่สกัดได้คิดเป็น %yield คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\%yield = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด}}{\text{น้ำหนักพืชก่อนสกัด}} \times 100$$

3.4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.4.2.1 วิธี DPPH Scavenging assay

การเตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.6 mM โดยชั่ง DPPH 11.83 mg ละลายในเมทานอล 50 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นหุ้มภาชนะ ด้วย foil เพื่อป้องกันแสง จากนั้นเตรียมสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลง ให้มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 mg/mL โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการผสมสารละลายของสารสกัดกับสารละลาย DPPH ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลองเทียบกับ positive control และ blank นำสารละลายต่างๆ

หลังจากทำปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 nm และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \text{Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสาร เพื่อหาค่า The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ทำการทดลองทั้งหมด 3 กลุ่ม ($n = 3$) กลุ่มละ 3 ซ้ำ (triplicate)

ตาราง 2 การใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging assay

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน 96-well plate (μL)			
	DPPH solution	Methanol	สารสกัด	Rutin*
Sample test	100	-	100	-
Blank sample test	-	100	100	-
Blank	100	100	-	-
Positive control	100	-	-	100

*Rutin at 0.08 mg/mL ใช้เป็น positive control

3.4.2.2 วิธี ABTS radical scavenging assay

เตรียมสารละลายของ ABTS radical solution โดยผสม 7 mM ABTS ในน้ำกลั่น กับ 2.45 mM $K_2S_2O_8$ ในน้ำกลั่น ด้วย อัตราส่วน 1:1 แล้วทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นให้นำมาเจือจางด้วยเอทานอลแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.74 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

1. เตรียมสารละลายของสารทดสอบในเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยเจือจาง stock solution ด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อเป็น sample test ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น

2. เตรียมสารละลายของ gallic acid ความเข้มข้น 1 mg/mL เพื่อเป็น positive control และใช้เอทานอลเป็น negative control

3. ปิเปตสารละลายของสารทดสอบ, สารละลาย gallic acid และเอทานอล อย่างละ 100 μ L ลงใน microplate โดยใช้ micropipette

4. เติมสารละลาย ABTS radical solution ปริมาณ 100 μ L ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารละลาย ABTS radical solution ทำปฏิกิริยากับสารละลายทดสอบทั้งหมด

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 nm และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \text{ABTS free radical scavenging} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{positive control}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

6. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้น เพื่อหาค่า The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ทำการทดลอง ทั้งหมด 3 กลุ่ม ($n = 3$) กลุ่มละ 3 ซ้ำ (triplicate)

ตาราง 3 การใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน 96-well plate (μ L)			
	ABTS	Ethanol	สารสกัด	Trolox
Sample test	100	-	100	-
Blank sample test	-	100	100	-
Blank control	100	100	-	-
Positive control	100	-	-	100

3.4.2.3 วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay)

การเตรียมสารละลายสำหรับ FRAP reagent

1. เตรียม 300 mM acetate buffer pH 3.6 โดยชั่ง sodium acetate trihydrate น้ำหนัก 1.5 g ละลายด้วย glacial acetic acid 8 mL ปรับปริมาตรจนครบ 500 mL ด้วย ultrapure water ใน volumetric flask

2. การเตรียม 20 mM $FeCl_3$ ชั่ง $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ น้ำหนัก 0.054 g ละลายด้วย Ultrapure water ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย ultrapure water ใน volumetric flask

3. การเตรียม 10 mM TPTZ โดยชั่ง TPTZ น้ำหนัก 0.0312 g ละลายด้วย 40 mM HCl (ปิเปต conc. HCl มา 164 μ L ใส่ Ultrapure water ปรับปริมาตรจนครบ 50 mL) ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย 40 mM HCl ใน volumetric flask

4. การเตรียมสารละลาย FeSO_4 ในช่วงความเข้มข้น 10-100 μM (ความเข้มข้นสุดท้าย) เตรียมโดยการชั่ง FeSO_4 0.0278 g ละลายด้วย ultrapure water ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วย ultrapure water ใน volumetric flask ได้ stock solution 1 mM FeSO_4 ปิเปต 1 mM FeSO_4 500 μL ใส่ acetate buffer 500 μL ได้ solution 0.5 mM FeSO_4 ผสม 300 mM acetate buffer + $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 mL ตามลำดับ จะได้ FRAP reagent สำหรับทดสอบ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

1. การเตรียมสารละลาย trolox ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ชั่ง trolox 5 mg ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วย methanol ใน volumetric flask
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้ acetate buffer เป็นตัวทำละลาย
3. การเตรียมสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลง ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้ acetate buffer เป็นตัวทำละลาย
4. เมื่อหยอดสารครบลงใน 96-well plate แล้ว นำ plate ไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาที และวัดค่า microplate reader ที่ ความยาวคลื่น 595 nm
5. นำค่าความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FeSO_4 มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ นำสมการที่ได้มาแทนคำนวณต่อไป
6. จากนั้นแทนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงในสมการข้อ 5 จะได้ค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารละลาย FeSO_4 (FeSO_4 conc. (μM)) และนำไปแทนค่าในสูตรด้านล่าง จะได้ค่า FRAP value มีหน่วยเป็น (mmol/100 g extract)

$$\text{FRAP value} = \frac{\text{FeSO}_4 \text{ conc. } (\mu\text{M}) \times \text{final volume (mL)} \times 100}{\text{Sample volume (mL)} \times 1000 \times \text{sample conc. (g/mL)} \times 1000}$$

$$\text{Sample volume (mL)} \times 1000 \times \text{sample conc. (g/mL)} \times 1000$$

ตาราง 4 การใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assay

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน 96-well plate (μL)				
	FRAP	Sample	buffer	Trolox	FeSO ₄
Standard (FeSO ₄)	80	-	-	-	20
Blank standard	-	-	80	-	20
Positive control (trolox)	80	-	-	20	-
Blank positive	-	-	80	20	-
Blank control	80	-	20	-	-
Sample test	80	20	-	-	-
Blank sample test	-	20	80	-	-

3.4.3 Mushroom tyrosinase inhibitory assay

1.การเตรียม 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) ทำการชั่ง NaH₂PO₄·H₂O น้ำหนัก 3.12 g และ Na₂HPO₄ น้ำหนัก 2.84 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1000 mL ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ปรับ pH 6.8 ด้วย 0.1N NaOH หรือ 20% H₂PO₄

2.การเตรียม tyrosinase ความเข้มข้น 240 unit/mL ปริมาณ 10 mL เตรียม ปริมาตร 10mL โดยที่ฉลากของเอนไซม์ระบุว่า มี tyrosinase 2130 unit/mg solid หากต้องการ เตรียมสารละลายความเข้มข้น 240 unit/mg จำนวน 10 mL จะต้องชั่งสาร tyrosinase มาจำนวน 1.12 mg จากการคำนวณ ดังแสดง

สาร 1 mg มี tyrosinase 2130 unit

ต้องการเตรียมสารปริมาตร 1mL ให้มีความเข้มข้น 240 unit/mg

ดังนั้นจะต้องเตรียม tyrosinase ปริมาณ $\frac{240}{2130} \times 10 = 1.13$ mg

วิธีเตรียมชั่ง tyrosinase จำนวน 1.13 mg ละลายด้วย phosphate buffer ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL สารละลายด้วย phosphate buffer

3.การเตรียมสารละลาย L-dopa ความเข้มข้น 10 mM ปริมาณ 5 mL เตรียมสารละลาย ความเข้มข้น 10 mM = 10×10^{-3} mol/L จำนวน 5 mL จะต้องชั่งสาร L-dopa มาจำนวน 9.86 mg จากการคำนวณ ดังแสดง

สารละลาย 1000 mL มี L-dopa $10 \times 10^{-3} \times 197.1$ g

สารละลาย 5 mL มี L-dopa $\frac{10 \times 10^{-3} \times 197.1 \times 5}{1000}$ g = 9.86 mg

4.วิธีการเตรียมทำการชั่ง L-dopa จำนวน 9.86 mg ละลาย L-dopa ด้วย phosphate buffer ใน volumetric flask ขนาด 5 mL ปรับปริมาตรสารละลายด้วย phosphate buffer จน ปริมาตรครบ 5 mL

5.การเตรียมสารละลาย kojic acid ทำการเตรียมสารละลาย stock solution ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL จำนวน 10 mL โดยชั่ง kojic acid จำนวน 50 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 mL ละลายด้วย DMSO 1000 μ L จากนั้นนำสารละลาย stock solution มาเจือจางด้วย phosphate buffer จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ 5 ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 6.25- 100 μ g/mL

6.การเตรียมสารละลายสารสกัดดอกพญาบาทหลวง ทำการเตรียมสารละลาย stock solution ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL จำนวน 5 mL จากนั้นนำสารละลาย stock solution มาเจือจาง ด้วย phosphate buffer จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ 5 ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2- 20 μ g/mL

ตาราง 5 ตารางการใส่สารลงใน 96- well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน 96-well plate (μ L)				
	phosphate buffer	kojic acid	สารสกัด	tyrosinase	L-dopa
Negative control	140	-	-	40	20
Blank negative control	180	-	-	-	20
Positive control	120	20	-	40	20
Blank positive control	160	20	-	-	20
Sample test	120	-	20	40	20
Blank sample test	160	-	20	-	20

นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของ Negative control และ Positive control ที่ได้มา คำนวณ %tyrosinase inhibition ของ Positive control จากสมการ

$$\% \text{tyrosinase inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D)}{A-B} \times 100$$

- เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ negative control
 B คือ ค่าการดูดกลืนแสง blank negative control
 C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ positive control
 D คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank positive control

3.4.4 การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method

การเตรียมสารละลายทดสอบ

เตรียมสารละลาย 10% v/v Folin-ciocalteu reagent โดยปิเปต Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 1000 μL เจือจางด้วยน้ำและปรับปริมาตรจนครบ 10 mL จากนั้นเตรียมสารละลาย 75 mg/mL sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 10 mL โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.03-0.5 mg/mL โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และเจือจางด้วยน้ำกลั่น เตรียมสารละลายของสารสกัดดอกพญากาหลง ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง 0.01g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย 80% เอทานอล

การทดสอบหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก

จะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและในแต่ละครั้งจะเป็นอิสระต่อกัน ดังนี้

1. ปิเปต Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 100 μL ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 mL สำหรับ control
2. ปิเปตสารละลายดอกพญากาหลง หรือสารละลายมาตรฐาน gallic acid ปริมาตร 100 μL สำหรับสารทดสอบ ปิเปต 75 mg/mL Na_2CO_3 ปริมาตร 100 μL สำหรับ control และ sample
3. ปิเปตน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 μL ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที
4. ปิเปตสารละลายในแต่ละหลอด ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 μL จำนวน 3 หลุม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เป็นกราฟมาตรฐาน
6. คำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกที่วัดค่าได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกพญาบาทหลวง โดยคำนวณมาเป็นมิลลิกรัมของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อปริมาณในหน่วยกรัมของสารสกัดดอกพญาบาทหลวง (mg/g)

ตาราง 6 การใส่สารลงใน centrifuge tube เพื่อหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน centrifuge tube (μL)				
	10%v/v Folin-Ciocalteu reagent	gallic acid	สารสกัด	75 mg/mL Na ₂ CO ₃	น้ำกลั่น
Negative control	100	-	-	100	800
Blank negative control	-	-	-	-	1000
Positive control	100	100	-	100	700
Blank positive control	-	100	-	-	900
Sample test	100	-	100	100	700
Blank sample test	-	-	100	-	900

3.4.5 การหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation

การเตรียมสารละลายทดสอบ

เตรียมสาร 8 mg/mL aluminium chloride (AlCl₃) โดยชั่ง AlCl₃ น้ำหนัก 0.24 g ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 30 mL ด้วยเอทานอล จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ระหว่าง 2.5-12.5 μg/mL โดยใช้ 50% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย และเตรียมสารสกัดดอกพญาบาทหลวง ความเข้มข้น 1 mg/mL (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 0.1 mg/mL) ซึ่งสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลืองและสีม่วง 10 mg ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย 80% เอทานอล

การทดสอบหาปริมาณรวมฟลาโวนอยด์

จะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและในแต่ละครั้งจะเป็นอิสระต่อกัน

1. ปิเปต AlCl_3 ปริมาตร 100 μL ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 mL สำหรับ control
2. ปิเปตสารละลายดอกพญากาหลง หรือสารละลายมาตรฐาน quercetin ปริมาตร 100 μL สำหรับ blank เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 μL ผสมสารละลายให้เข้ากัน
3. Incubate สารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที ในที่มืด
4. ปิเปตสารละลายในแต่ละหลอด ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 μL จำนวน 3 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin เป็นกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ที่วัดค่าได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกพญากาหลง โดยคำนวณมาเป็นมิลลิกรัมของ quercetin ต่อปริมาณในหน่วยกรัมของสารสกัดดอกพญากาหลง (mg/g)

ตาราง 7 การใส่สารลงใน centrifuge tube เพื่อหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์วิธี aluminium chloride complexation

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน centrifuge tube (μL)			
	8 mg/ml (AlCl_3)	quercetin	สารสกัด	เอทานอล
Negative control	100	-	-	900
Blank negative control	-	-	-	1000
Positive control	100	100	-	800
Blank positive control	-	100	-	900
Sample test	100	-	100	800
Blank sample test	-	-	100	900

3.4.6 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย UHPLC-UV-MS

1. การเตรียม mobile phase A หรือ 0.1% formic acid ปิเปต pure formic acid ปริมาตร 1 mL ผสมใน ultrapure water 1000 mL และจากนั้นนำไปกรองด้วย 0.22 micron Nylon membrane filter และนำไป degas ด้วยเครื่อง ultrasonic bath การเตรียม mobile phase B หรือ

acetonitrile เตรียม acetonitrile 1000 mL และจากนั้นนำไปกรองด้วย 0.22 micron nylon membrane filter และนำไป degas ด้วยเครื่อง ultrasonic bath

2. การเตรียม diluent เตรียม 80% methanol โดยผสม methanol 800 mL และ ultrapure water 200 mL จากนั้นนำไปกรองผ่าน 0.22 micron Nylon membrane filter และนำไป sonicate 15 นาที

3. การเตรียม stock standard solution (0.1 mg/mL) ซึ่งสารมาตรฐาน gallic acid, chlorogenic acid, Ideain chloride, ellagic acid, rutin, isoquercetin, และ quercetin อย่างละ 0.01 g ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 80% methanol จนปริมาตรถึง 3 ใน 4 ของ volumetric flask 10 mL จากนั้นนำไป sonicate จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรด้วย 80% methanol จนปริมาตรครบ 10 mL แล้วนำไปกรองผ่าน 0.22 micron nylon membrane filter จากนั้นปิเปตมา 1 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL เพื่อให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL

4. การเตรียมสารตัวอย่าง ซึ่งสารสกัดดอกพญากาหลง 10 mg ใส่ volumetric flask ขนาด 10 mL แล้วเติม 80% methanol ปริมาตร 8 mL แล้วจึงนำไปเร่งการละลายด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปกรองผ่าน 0.22 micron nylon membrane filter

5. การวิเคราะห์ด้วย UHPLC สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นดังนี้

Stationary phase : C18 (3 x 150 mm, 2.7 μ m)

Mobile phase : 0.1% formic acid : acetonitrile

Flow rate : 0.6 ml/min

Temperature : 30 °C

Injection volume : 5 μ L

Detector : UV 359, 520 nm และ MS full scan mode m/z 100-1000

ตาราง 8 ระบบ UHPLC-UV-MS และ gradient elution

Time (min)	% MP A	% MP B
0.0	95	5
50.0	0	100
55.0	0	100
55.1	95	5
60.0	95	5

3.4.7 การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลง

1. การเตรียม mobile phase A หรือ 0.1% formic acid ปิเปิด pure formic acid ปริมาตร 1 mL ผสมใน ultrapure water 1000 mL และจากนั้นนำไปกรองด้วย 0.22 micron Nylon membrane filter และนำไป degas ด้วยเครื่อง Ultrasonic bath การเตรียม mobile phase B หรือ acetonitrile เตรียม acetonitrile 1000 mL และจากนั้นนำไปกรองด้วย 0.22 micron Nylon membrane filter และนำไป degas ด้วยเครื่อง ultrasonic bath

2. การเตรียม diluent เตรียม 80% methanol โดยผสม methanol 800 mL และ ultrapure water 200 mL จากนั้นนำไปกรองผ่าน 0.22 micron Nylon membrane filter และนำไป sonicate 15 นาที

3. การเตรียม stock standard solution (0.1 mg/mL) ซึ่งสารมาตรฐาน quercetin, rutin และ isoquercetin อย่างละ 0.01 g ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 80% methanol จนปริมาตรถึง 3 ใน 4 ของ volumetric flask 10 mL จากนั้นนำไป sonicate จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรด้วย 80% methanol จนปริมาตรครบ 10 mL แล้วนำไปกรองผ่าน 0.22 micron Nylon membrane filter จากนั้นปิเปิดมา 1 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL เพื่อให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL

4. การเตรียมสารตัวอย่าง ซึ่งสารสกัดดอกพญากาหลง 10 mg ใส่ volumetric flask ขนาด 10 mL แล้วเติม 80% methanol ปริมาตร 8 mL แล้วจึงนำไปเร่งการละลายด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปกรองผ่าน 0.22 micron Nylon membrane filter

5. การวิเคราะห์ด้วย UHPLC สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นดังนี้

Stationary phase	: C18 (3 x 150 mm, 2.7 μ m)
Mobile phase	: 0.1% formic acid : acetonitrile
Flow rate	: 0.6 ml/min
Temperature	: 30 °C
Injection volume	: 5 μ L
Detector	: UV detector 359 nm

ตาราง 9 ระบบ UHPLC-UV และ gradient elution ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา

Time (min)	% MP A	% MP B
0	85.0	15.0
5.00	72.5	27.5
6.00	0	100.0
6.01	0	100.0
7.00	85.0	15.0

3.4.7.1 การศึกษา system suitability

ทำการปรับสมดุลของ column ด้วย mobile phase เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เตรียม sample solution ของสารสกัดจากดอกพญากาหลงที่มีความเข้มข้นของ rutin ประมาณ 100 µg/mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ครั้ง จากนั้นบันทึกค่า capacity factor, tailing factor, resolution, number of theoretical plates และ %RSD ของค่า retention time และ peak area

3.4.7.2 การศึกษา method validation

1. Specificity

เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin, rutin และ isoquercetin และสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC โดยเทียบค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

2. Linearity

เตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/ml จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC นำไป plot กราฟหาความสัมพันธ์ และสมการเส้นตรง แสดงด้วยค่า correlation coefficient (r), slope (a) และ y-intercept (b) ของสมการ

$$y = ax + b \text{ ค่า correlation coefficient ต้องไม่น้อยกว่า 0.99}$$

3. Accuracy และ precision

ใช้วิธี standard addition โดยปิเปตสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลง 0.5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ทั้งหมด 12 ขวด เติม 80% methanol ปริมาตร 5 mL จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน rutin ปริมาตร 0.1, 0.3 และ 0.7 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ข้างต้น ปริมาตรละ 3 ขวด เป็นทั้งหมด 9 ขวด แล้วปรับปริมาตรด้วย 80%

methanol จนครบ 10 mL จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC นำค่า peak area ที่ได้แทนลงในสมการเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน rutin นำค่าความเข้มข้นที่ได้จากสมการมาคำนวณ %recovery ค่าที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 98-105% และ %RSD โดยค่าที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 1.9% อ้างอิงตาม AOAC guidelines

4. Limit of detection (LOD)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/ml จากนั้นทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ครั้ง และสร้างสมการเส้นตรง คำนวณค่าเฉลี่ยของ slope และ SD ของ y-intercept จากนั้นคำนวณค่า LOD จากสูตร

$$\text{LOD} = \frac{3.3\text{SD}}{\text{Slope}}$$

SD = standard deviation of y-intercepts

Slope = average slope from 3 equations

5. Limit of quantitation (LOQ)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/ml จากนั้นทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ครั้ง และสร้างสมการเส้นตรง คำนวณค่าเฉลี่ยของ slope และ SD ของ y-intercept จากนั้นคำนวณค่า LOQ จากสูตร

$$\text{LOQ} = \frac{10\text{SD}}{\text{Slope}}$$

SD = standard deviation of y-intercepts

Slope = average slope from 3 equations

พิจารณาหาความเข้มข้นที่ทำให้ค่า signal-to-noise เท่ากับ 10:1 เตรียมและฉีดสารมาตรฐานในความเข้มข้นดังกล่าวซ้ำ เพื่อยืนยันว่าเป็นความเข้มข้นดังกล่าวเป็น LOQ เตรียมสารความเข้มข้นเท่ากับ LOQ จำนวน 10 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์หาความถูกต้อง และแม่นยำ

3.4.8 การวิเคราะห์การหาปริมาณ rutin ในสารสกัดจากดอกพญาบาทหลวง

ชั่งสารสกัดดอกพญาบาทหลวงมา 5.00 mg ใส่ใน ใส่น้ำใน volumetric flask ขนาด 5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 80% methanol จนปริมาตรถึง 3 ใน 4 ของ volumetric flask 5 mL จากนั้นนำไป sonicate จนได้สารละลายใส ปรับปริมาตรด้วย 80% methanol จนปริมาตรครบ 5 mL แล้วนำไปกรองผ่าน 0.22 micron nylon membrane filter จากนั้นปิเปตมา 1 mL แล้วปรับ

ปริมาตรจนครบ 10 mL เพื่อให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL เตรียมและฉีดสารในความเข้มข้น
ดังกล่าว 3 ซ้ำ



บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดจากดอกพญากาหลง

จากการนำดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมาสกัดด้วย 80% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:20 พบว่าปริมาณสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมี %yield ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 28.8 และ 33.3% ตามลำดับ สารสกัดที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม ช้น หนืด (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)

ตาราง 10 น้ำหนักแห้ง น้ำหนักสารสกัด และผล % yield crude extract สารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)

ชนิด	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)	% yield
BW	7.54	2.17	28.78%
BV	6.21	2.07	33.33%

4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging assay

เมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงด้วยวิธี DPPH Scavenging assay พบว่า สารมาตรฐาน rutin ที่ความเข้มข้น ระหว่าง 1.27 – 20.30 $\mu\text{g/mL}$ มี %inhibition อยู่ในช่วง 9.40-71.95 ในสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองที่ความเข้มข้น 5.96-95.40 $\mu\text{g/mL}$ มี %inhibition อยู่ในช่วง 8.81-82.20 และในสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงที่ความเข้มข้น 5.77-92.34 $\mu\text{g/mL}$ มี %inhibition อยู่ในช่วง 10.71- 84.78 ทั้งนี้สารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 13.30 ± 0.42 , 51.31 ± 3.15 และ 45.48 ± 5.24 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีความสามารถในการจับ

อนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง เมื่อพิจารณาผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน rutin (n=3) ด้วยวิธี DPPH

Scavenging assay

Rutin conc. (µg/mL)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
1.27	9.44	8.00	10.77	9.40	1.38
2.54	11.49	11.25	16.48	13.07	2.95
5.08	21.47	21.32	24.03	22.28	1.52
10.15	39.40	39.01	41.11	39.84	1.12
20.30	72.96	73.17	69.71	71.95	1.94

ตาราง 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี

DPPH Scavenging assay

BW conc. (µg/mL)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
5.96	8.39	8.30	9.74	8.81	0.81
11.93	13.05	13.23	13.77	13.35	0.38
23.85	24.99	25.08	25.89	25.32	0.50
47.70	47.01	47.37	48.36	47.58	0.70
95.40	83.82	81.65	81.11	82.20	1.43

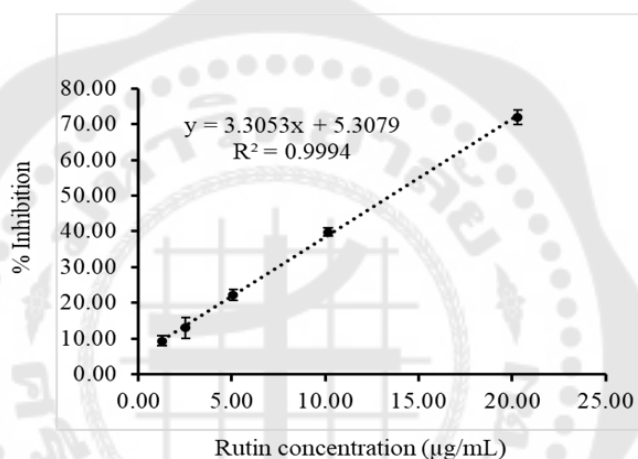
ตาราง 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี

DPPH Scavenging assay

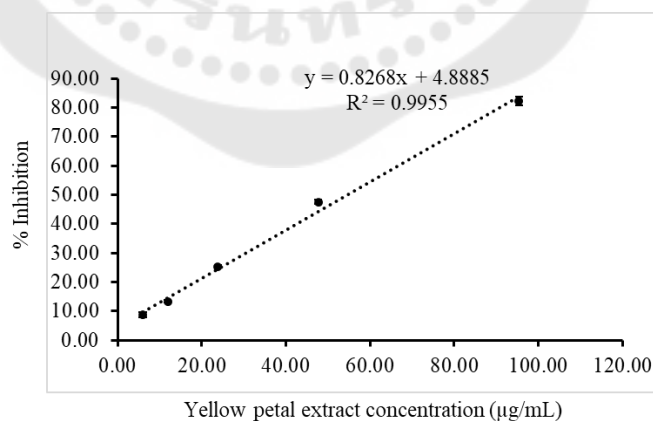
BV conc. (µg/mL)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
5.77	11.10	10.29	10.74	10.71	0.41
11.54	17.92	16.75	18.11	17.59	0.73
23.09	31.61	31.52	32.33	31.82	0.45
46.17	57.08	52.75	56.99	55.61	2.47
92.34	89.95	80.39	84.00	84.78	4.83

ตาราง 14 สรุปค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) ($n=3$) ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay

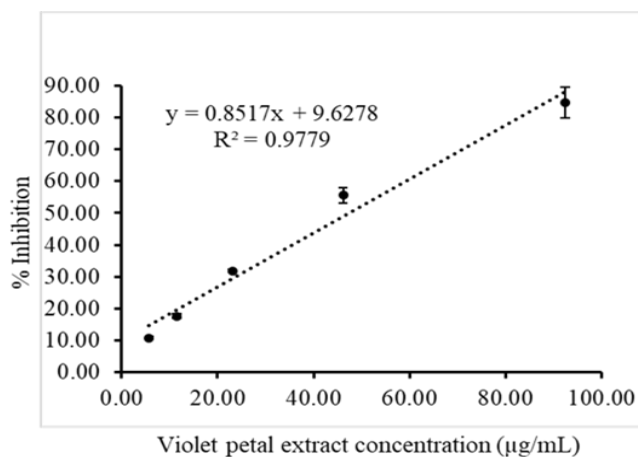
Compounds	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Mean	SD
Rutin	13.47	12.82	13.60	13.30	0.42
BW	54.56	48.26	51.09	51.31	3.16
BV	49.50	39.55	47.40	45.48	5.24



ภาพประกอบ 9 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH Scavenging assay ของสารมาตรฐาน rutin



ภาพประกอบ 10 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH Scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW)



ภาพประกอบ 11 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH Scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV)

4.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

เมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay พบว่า พบว่าสารมาตรฐาน rutin ที่ความเข้มข้น ระหว่าง 1.24–19.88 µg/mL มี %inhibition อยู่ในช่วง 13.46–95.40 ในสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองที่ความเข้มข้น 3.20–51.16 µg/mL มี %inhibition อยู่ในช่วง 9.52–89.20 และในสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงที่ความเข้มข้น 2.91–34.95 µg/mL มี %inhibition อยู่ในช่วง 17.48–94.94 สารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.65 ± 0.31 , 27.33 ± 0.92 , 16.02 ± 0.55 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

ตาราง 15 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน rutin (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

Rutin conc. (µg/mL)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
1.24	13.39	13.60	13.39	13.46	0.12
2.48	24.67	22.56	21.25	22.83	1.73
4.97	39.38	37.06	37.26	37.90	1.28
9.94	70.59	67.37	66.67	68.21	2.09
19.88	96.07	95.57	94.56	95.40	0.77

ตาราง 16 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

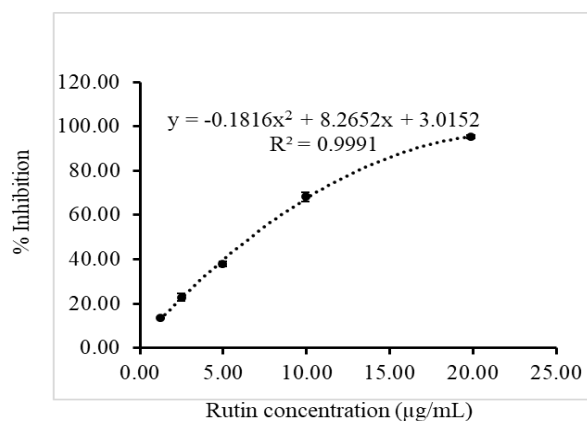
BW conc. (µg/mL)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
3.20	9.30	10.26	9.01	9.52	0.65
6.39	9.68	14.09	14.96	12.91	2.83
12.79	24.83	25.60	28.28	26.24	1.81
25.58	47.17	48.03	51.97	49.06	2.56
51.16	90.41	86.39	90.80	89.20	2.44

ตาราง 17 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

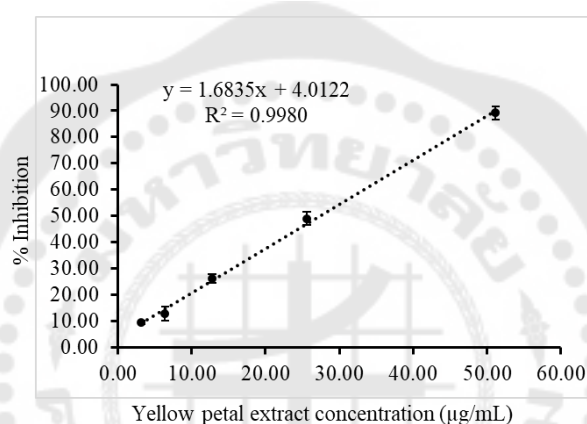
BV conc. (µg/mL)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
2.91	17.29	18.16	17.00	17.48	0.60
5.82	25.74	23.63	21.52	23.63	2.11
11.64	42.07	43.04	35.73	40.28	3.97
23.28	71.18	68.88	69.74	69.93	1.16
34.95	94.33	96.25	94.24	94.94	1.14

ตาราง 18 สรุปค่า IC_{50} (µg/mL) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) สารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

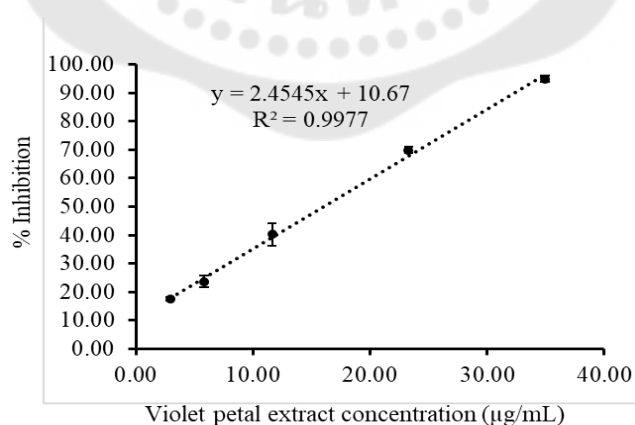
Compounds	IC_{50} (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)	Mean	SD
Rutin	6.32	6.80	6.88	6.67	0.31
BW	27.71	28.00	26.27	27.33	0.92
BV	15.68	15.72	16.66	16.02	0.55



ภาพประกอบ 12 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging assay ของสารมาตรฐาน rutin



ภาพประกอบ 13 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW)



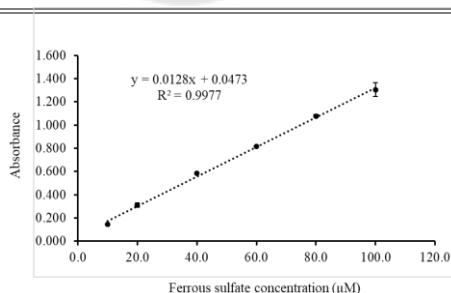
ภาพประกอบ 14 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV)

4.2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay)

ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระกับ ferric ion ด้วยวิธี FRAP assay จากกราฟแสดงความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate ความเข้มข้น 10-100 μM พบว่ามีค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.145-1.304 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลืองและสีม่วง พบว่า สารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลืองและสีม่วงมีค่า Ferrous sulfate equivalent เท่ากับ 721.500 ± 39.472 , 100.621 ± 6.149 และ 132.325 ± 5.574 mmol/100g extract ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีม่วงมีความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

ตาราง 19 แสดงความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน ferrous sulfate

Ferrous sulfate conc. (μM)	Absorbance				
	1	2	3	Mean	SD
10.000	0.142	0.147	0.145	0.145	0.003
20.000	0.285	0.280	0.251	0.311	0.019
40.000	0.549	0.551	0.554	0.587	0.003
60.000	0.780	0.781	0.787	0.818	0.003
80.000	1.038	1.033	1.055	1.078	0.011
100.000	1.314	1.284	1.200	1.304	0.060



ภาพประกอบ 15 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน ferrous sulfate

ตาราง 20 แสดงฤทธิ์ Ferrous sulfate equivalent (mmol/100g extract) ของสารมาตรฐาน rutin สกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลือง (BW) และสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay)

Compounds	Ferrous sulfate equivalent (mmol/100g extract)				
	1	2	3	Mean	SD
Rutin	765.625	709.325	689.549	721.500	39.472
BW	101.497	94.081	106.284	100.621	6.149
BV	137.956	132.209	126.810	132.325	5.574

4.3 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay โดยสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 93.36 ± 2.73 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลือง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.67 ± 11.59 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน kojic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.76 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อรายงานค่าเป็น %inhibition พบว่าสารมาตรฐาน kojic acid ที่ความเข้มข้น ระหว่าง 6.31-25.25 $\mu\text{g/mL}$ มี %inhibition อยู่ในช่วง 17.27-64.78 ในสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลืองที่ความเข้มข้น 64.08-106.80 $\mu\text{g/mL}$ มี %inhibition อยู่ในช่วง 34.14-47.58 และในสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วงที่ความเข้มข้น 55.50-99.90 $\mu\text{g/mL}$ มี %inhibition อยู่ในช่วง 33.56-54.39 แต่เมื่อนำ %inhibition ไปทดสอบทางสถิติพบว่าสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไทโรซิเนสได้มากกว่าสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลือง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

ตาราง 21 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ kojic acid (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay

Kojic acid conc. ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
6.31	23.48	17.06	11.27	17.27	6.11
9.47	25.99	28.91	30.32	28.41	2.21
12.63	39.89	41.71	38.49	40.03	1.61

15.78	50.99	49.88	46.96	49.28	2.08
18.94	53.27	52.92	54.61	53.60	0.89
22.10	61.74	60.86	62.09	61.57	0.63
25.25	63.14	64.08	67.11	64.78	2.08

ตาราง 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay

BW conc. ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
64.08	34.57	36.91	30.93	34.14	3.01
74.76	38.01	36.84	39.38	38.08	1.27
85.44	40.41	38.83	41.24	40.16	1.22
96.12	45.36	42.13	44.88	44.12	1.74
106.80	45.91	46.25	50.58	47.58	2.60

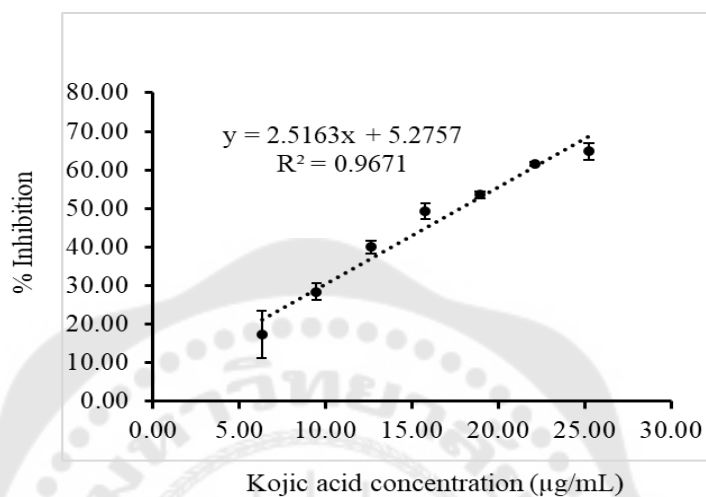
ตาราง 23 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay

BV conc. ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition	% Inhibition	% Inhibition	Mean	SD
55.50	29.76	34.13	36.80	33.56	3.55
66.60	37.96	40.49	41.14	39.86	1.68
77.70	44.00	45.42	45.54	44.99	0.86
88.80	50.85	50.06	51.61	50.84	0.77
99.90	54.25	58.20	50.71	54.39	3.75

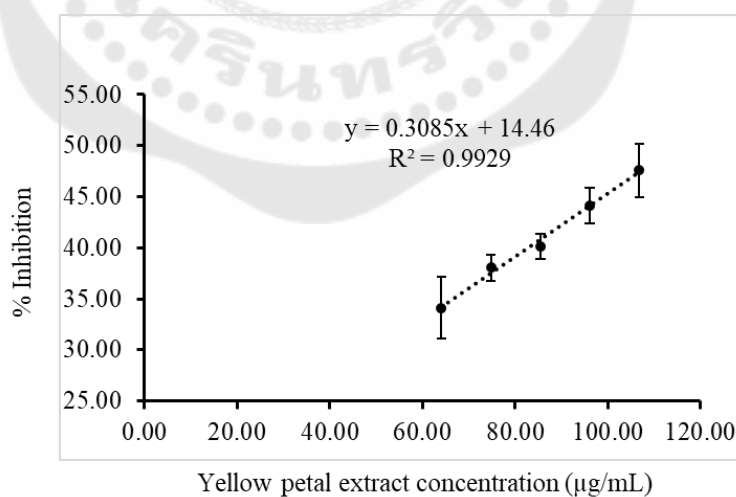
ตาราง 24 สรุปค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลือง (BW) และสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay

Compounds	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Mean	SD
Kojic acid	17.73	17.78	17.78	17.76	0.03

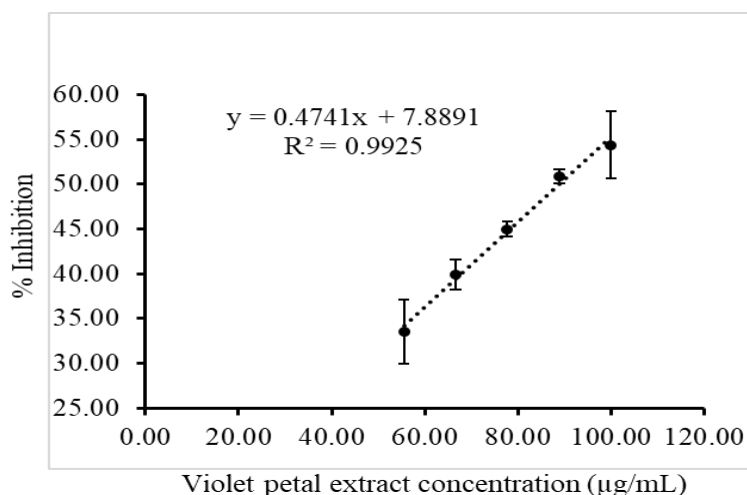
BW	117.98	129.10	105.93	117.67	11.59
BV	94.01	90.36	95.70	93.36	2.73



ภาพประกอบ 15 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน kojic acid (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay



ภาพประกอบ 16 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง (BW) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay



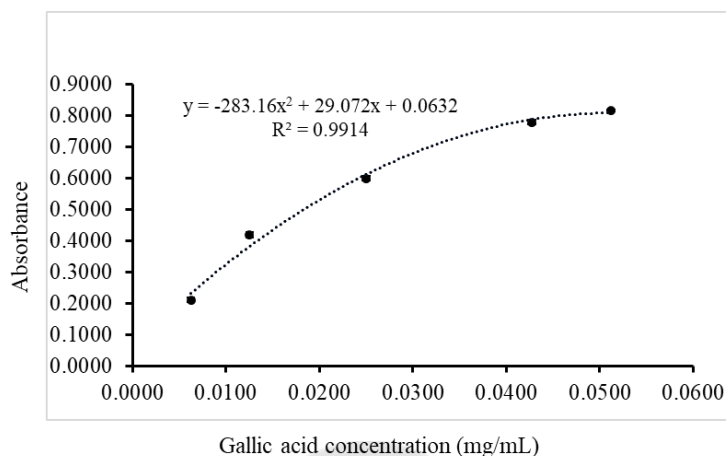
ภาพประกอบ 17 กราฟระหว่างความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3) ด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay

4.4 การศึกษาหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method

จากการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method พบว่า สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมีค่าของปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมดเท่ากับ 18.13 ± 0.19 และ 18.01 ± 0.7 mg of gallic acid/g of extracts เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น ระหว่าง 0.00625-0.05120 mg/mL สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองมีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกไม่แตกต่างจากสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

ตาราง 25 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid

Gallic acid conc. (mg/mL)	Absorbance				
	1	2	3	Mean	SD
0.00625	0.2020	0.2147	0.2161	0.2109	0.0078
0.01250	0.4113	0.4180	0.4300	0.4198	0.0095
0.02500	0.5920	0.6013	0.6067	0.6000	0.0074
0.04271	0.7733	0.7803	0.7860	0.7799	0.0063
0.05120	0.8163	0.8193	0.8140	0.8166	0.0027



ภาพประกอบ 18 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน gallic acid

ตาราง 26 ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)

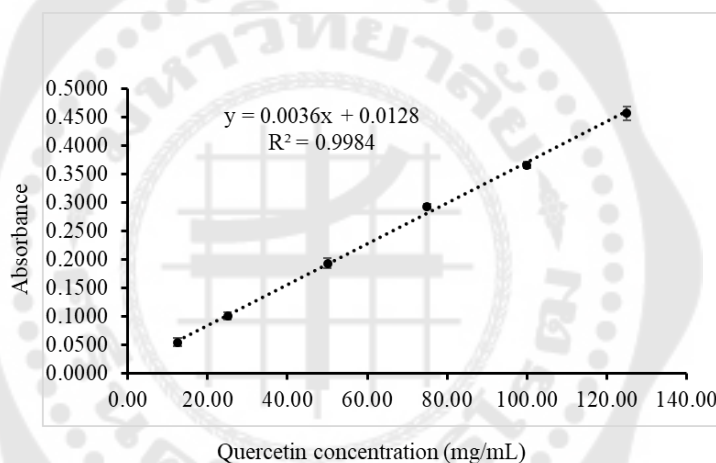
Compounds	mg of gallic acid/g of extracts				
	1	2	3	Mean	SD
BW	18.23	18.25	17.92	18.13	0.19
BV	17.89	18.20	17.95	18.01	0.17

4.5 การศึกษาหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation

จากการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation พบว่า โดยสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองมีค่าของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 76.7002 ± 0.74 mg of quercetin/g of extracts และ สารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีค่าของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 97.2056 ± 0.06 mg of quercetin/g of extracts เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น ระหว่าง 12.50-125.00 mg/mL สารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์มากกว่าในสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

ตาราง 27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน quercetin

Quercetin conc. (mg/mL)	Absorbance				
	1	2	3	Mean	SD
12.50	0.0620	0.0537	0.0473	0.0543	0.0074
25.00	0.1067	0.0987	0.0947	0.1000	0.0061
50.00	0.2020	0.1913	0.1843	0.1926	0.0089
75.00	0.2963	0.2950	0.2877	0.2930	0.0047
100.00	0.3667	0.3707	0.3587	0.3653	0.0061
125.00	0.4680	0.4567	0.4443	0.4563	0.0118



ภาพประกอบ 19 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน quercetin

ตาราง 28 ปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation ในสารสกัดจากดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)

Compounds	mg of quercetin/g of extracts				
	1	2	3	Mean	SD
BW	77.03	77.21	75.86	76.7002	0.7371
BV	97.17	97.17	97.27	97.2056	0.0574

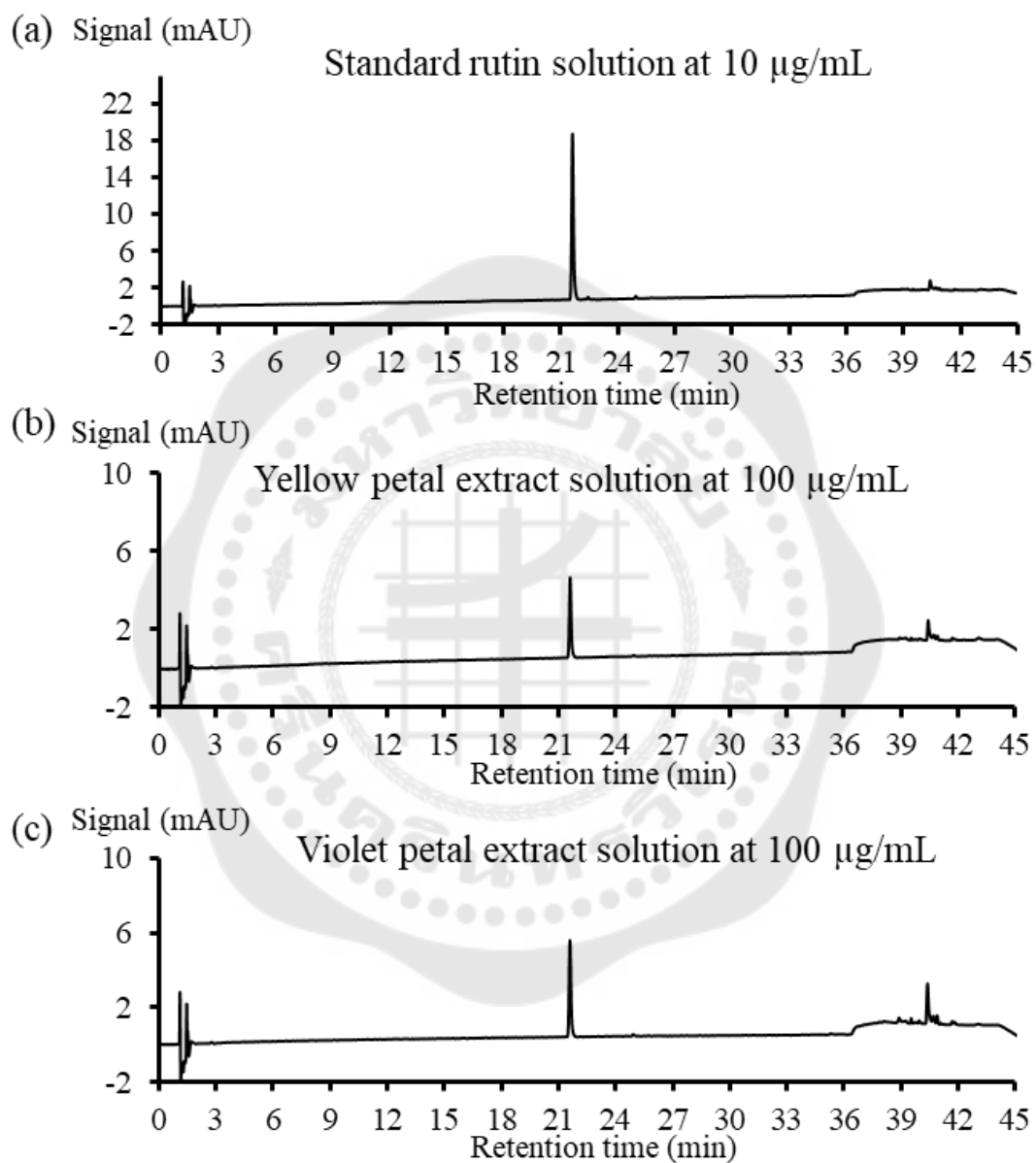
4.6 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วย UHPLC-UV-MS

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC-UV-MS ในการทดลองนี้ได้ใช้สารมาตรฐานจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ gallic acid, chlorogenic acid, Ideain chloride, ellagic acid,

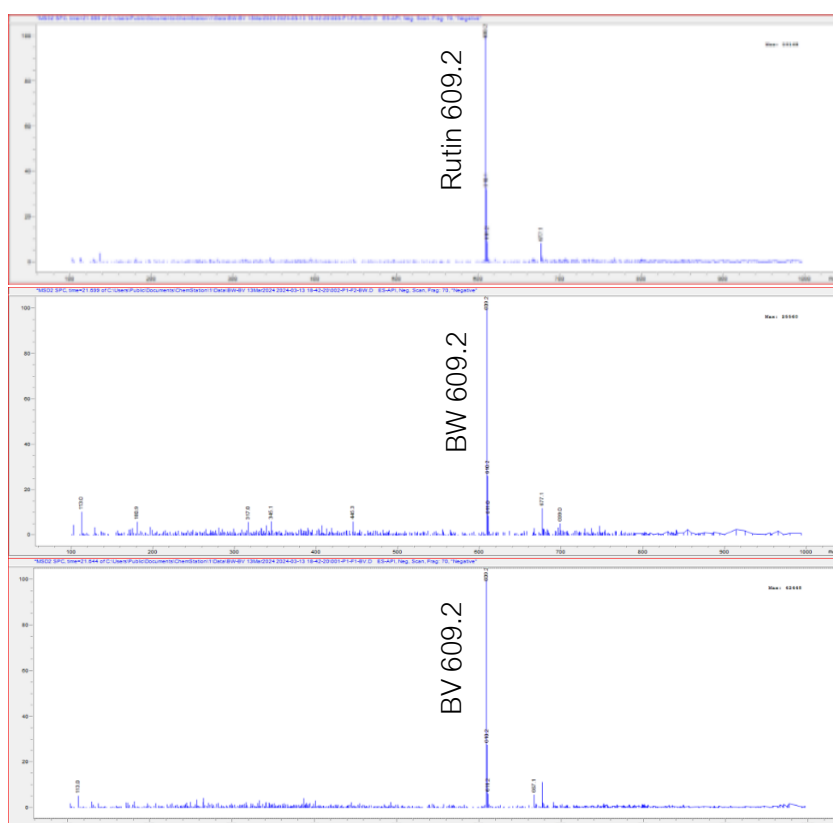
rutin, isoquercetin, และ quercetin โดยพบว่า retention time มีค่าเท่ากับ 2.530, 9.143, 10.510, 21.314, 21.521, 22.454 และ 35.318 นาที ตามลำดับ เมื่อฉีดสารละลายตัวอย่าง BW, BV พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 21.628 และ 21.618 นาที ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการตรวจวัดด้วย Mass ในโหมดประจุลบ พบว่ามีมวลโมเลกุลหลักเท่ากับ 609.2 ซึ่งค่า retention time และค่ามวลโมเลกุลหลักนี้มีค่าตรงกับสารมาตรฐาน rutin จึงสรุปได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลืองและสีม่วงเป็น rutin นอกจากนี้การวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ไม่ปรากฏฟีดของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน

ตาราง 29 แสดงผลการศึกษาค่าองค์ประกอบทางเคมีด้วย UHPLC-UV-MS ของสารมาตรฐาน gallic acid, chlorogenic acid, Ideain, chloride, ellagic acid, rutin, isoquercetin, quercetin และสารตัวอย่างสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)

Compounds	Wavelength (nm)	Retention time (min)	Mode	Retention time (min)	Mass peak
Gallic acid	280	2.530	Negative	2.546	169
Chlorogenic acid	320	9.143	Positive, Negative	9.172, 9.184	355.1, 353.2
Ideain chloride	520	10.510	Positive	10.919	449.1
Ellagic acid	359	21.314	Positive, Negative	NA	NA
Rutin	359	21.521	Negative	21.667	609.2
BV	359	21.618	Negative	21.647	609.2
BW	359	21.628	Negative	21.672	609.2
Isoquercetin	359	22.454	Negative	22.472	463.1
Quercetin	359	35.318	Negative	35.365	301.1



ภาพประกอบ 20 กราฟมาตรฐาน retention time และ signal (mAU) ของสารมาตรฐาน rutin
สารสกัดดอกพญาบาทลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)



ภาพประกอบ 21 Mass spectrum ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง (BV)

4.7 การพัฒนาและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลง

4.7.1 การศึกษา system suitability

จากการทดลองการศึกษา system suitability ของวิธีวิเคราะห์ต่อสาร rutin ในสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง พบว่าระบบมีความเหมาะสมในการศึกษา เนื่องจากบันทึกค่า capacity factor, tailing factor และ number of theoretical plates ของสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองเท่ากับ 3.325, 1.403 และ 28492.426 ของสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง เท่ากับ 1.768, 1.013 และ 13156.213 ตามลำดับ โดยผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์อย่างเหมาะสม มี %RSD ของค่า retention time และ peak area มีค่าน้อยกว่า 1% แสดงให้เห็นว่าระบบ UHPLC ที่ใช้มีความเหมาะสม

ตาราง 30 แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ system suitability ในสภาวะ water : acetonitrile ในสัดส่วน 0-5 min, 15% acetonitrile; 5-6 min, 27.5-100% acetonitrile และ 6.01-7 min, 100-15% acetonitrile ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) ความเข้มข้น 0.1 mg/mL (n=6)

n = 6	Retention time	Peak area	capacity factor	tailing factor	No. of theoretical plates	Resolution (before)	Resolution (before)	UV purity
mean	3.801	278.27	1.77	1.02	13247.21	20.67	6.21	999.85
SD	0.00	0.31	0.00	0.03	43.91	1.90	0.07	0.16
%RSD	0.09	0.11	0.18	2.91	0.33	9.18	1.08	0.02

ตาราง 31 แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ system suitability ในสภาวะ water : acetonitrile ในสัดส่วน 0-5 min, 15% acetonitrile; 5-6 min, 27.5-100% acetonitrile และ 6.01-7 min, 100-15% acetonitrile ของสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) 0.1 mg/mL (n=6)

n = 6	Retention time	Peak area	capacity factor	tailing factor	No. of theoretical plates	Resolution (before)	Resolution (before)	UV purity
mean	3.803	232.747	1.77	1.01	13156.21	20.97	6.29	999.88
SD	0.00	0.26	0.00	0.02	25.78	1.43	0.10	0.10
%RSD	0.04	0.11	0.10	2.23	0.20	6.80	1.63	0.01

4.7.2 การศึกษา method validation

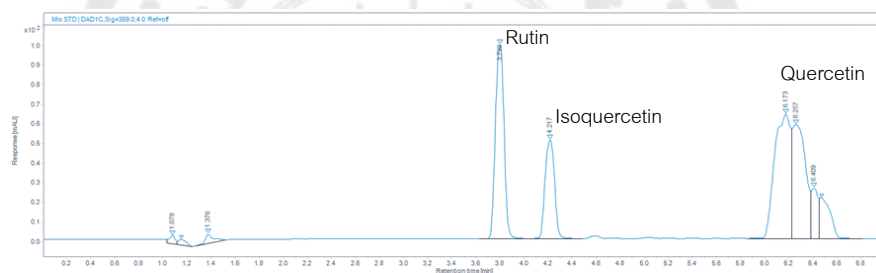
4.7.2.1 Specificity

จากผลการทดลองสารละลายมาตรฐานผสมของสารละลายมาตรฐานของ rutin ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากสามารถแยกสาร rutin ในสารละลายมาตรฐาน, สารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและดอกพญากาหลงสีม่วง โดยมีค่า resolution (R) ระหว่างพีคของ rutin กับพีคด้านหน้าและพีคด้านหลังเท่ากับ 18.41 และ 3.05 ตามลำดับ เมื่อทำการฉีดสารละลายมาตรฐานของ quercetin และ isoquercetin พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 6.163 และ 4.219 นาที ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าพีคของ rutin ไม่ถูกรบกวน

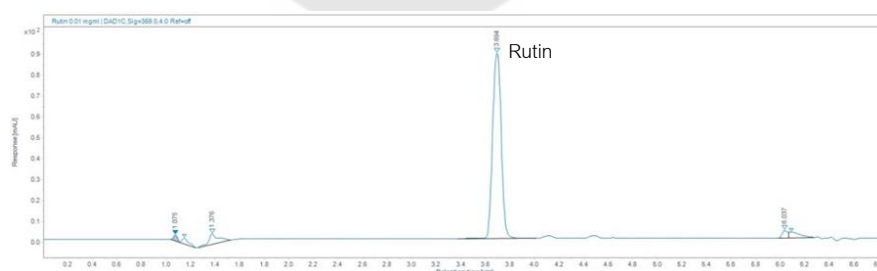
ด้วยสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ เมื่อตรวจสอบ Peak purity ของ rutin ในสารละลายมาตรฐาน, สารละลายสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลืองและดอกพญาบาทหลงสีม่วงเท่ากับ 999.99, 999.98 และ 999.86 ตามลำดับ



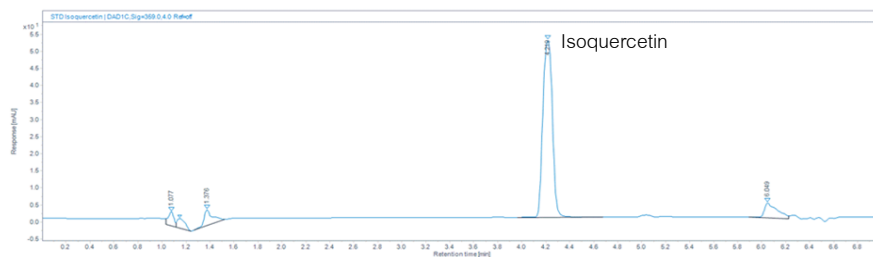
ภาพประกอบ 22 แสดง UHPLC chromatogram ของตัวทำละลาย (diluent)



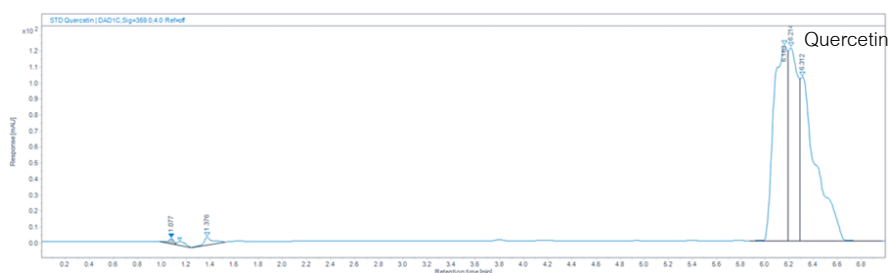
ภาพประกอบ 23 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานผสมของ rutin, isoquercetin และ quercetin ที่ความเข้มข้น 0.04 mg/mL



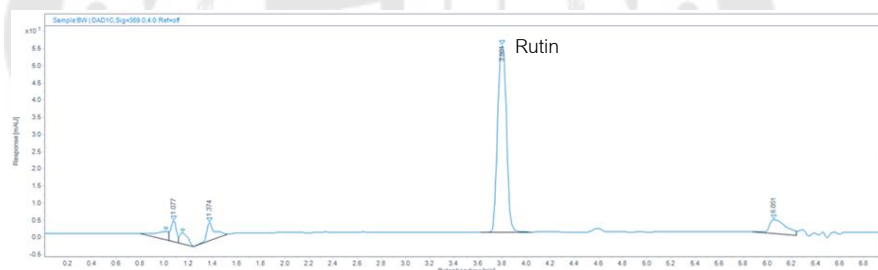
ภาพประกอบ 24 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ rutin ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/mL



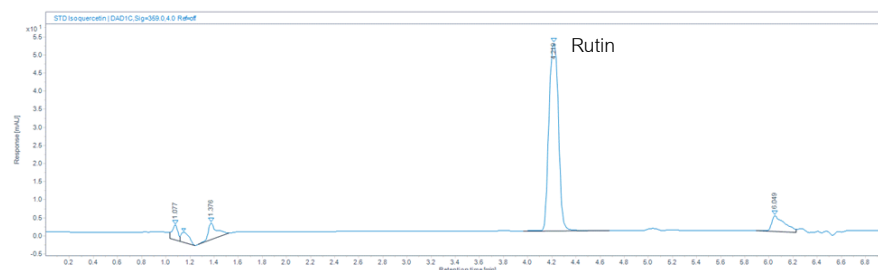
ภาพประกอบ 25 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ isoquercetin ที่
ความเข้มข้น 0.1 mg/mL



ภาพประกอบ 26 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ quercetin ที่
ความเข้มข้น 0.1 mg/mL



ภาพประกอบ 27 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายสารสกัดดอกพญาบาทหลงสี
เหลือง *Bauhinia tomentosa* L.



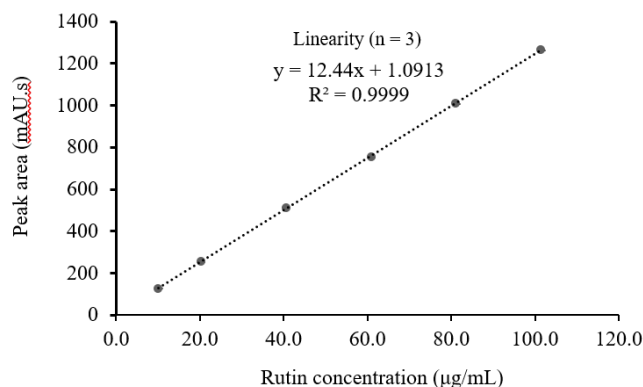
ภาพประกอบ 28 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วง
Bauhinia tomentosa L.

4.7.2.2 Linearity

เป็นการแสดงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยการสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน rutin 10.15-101.5 $\mu\text{g/mL}$ (แกน X) กับ peak area (แกน Y) โดยสมการเส้นตรง, ค่า correlation coefficient (R) และ linearity ของ rutin แสดงได้ดังตารางที่ 6 จะเห็นว่าค่า correlation coefficient (R) ที่ได้จากสมการเส้นตรงของ rutin มีค่าเท่ากับ 0.9999 ทั้งนี้ AOAC guidelines กำหนดให้ค่า correlation coefficient ไม่น้อยกว่า 0.99

ตาราง 32 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ให้ความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรง, สมการเส้นตรง และค่า correlation coefficient (n = 3)

Standard	Range ($\mu\text{g/mL}$)	Linear regression equation	Correlation coefficient (R)
Rutin	10.15-101.5	$y = 12.44x + 1.0913$	0.9999



ภาพประกอบ 29 calibration curve ของสารมาตรฐาน rutin (n=3)

4.7.2.3 Accuracy

จากการทดลองการศึกษาค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง ด้วยวิธี Standard addition ซึ่งเป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในกรณีที่ไม่ใช่ placebo ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรที่มีสารที่รบกวนการวิเคราะห์ อีกทั้งยังสามารถยืนยันว่ามี rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลง ทำได้โดยเปิดสารสกัดจากดอกพญากาหลง สีขาวที่ความเข้มข้น rutin เฉลี่ยเท่ากับ 11.76 $\mu\text{g/mL}$ แล้วใส่

สารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 10.15, 30.45 และ 71.05 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของ rutin ทั้งหมดได้เท่ากับ 21.98, 42.17 และ 82.21 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยพบปริมาณ rutin จากการวิเคราะห์เท่ากับ 10.21, 30.41 และ 70.44 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อนำมาคำนวณหา %recovery $\pm$ %RSD พบว่ามีค่า 100.59 $\pm$ 1.52, 99.86 $\pm$ 1.59 และ 99.14 $\pm$ 1.28 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วง จะเปิดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น rutin เฉลี่ยเท่ากับ 14.62 $\mu\text{g/mL}$ แล้วใส่สารละลายมาตรฐาน Rutin ความเข้มข้น 10.15, 30.45 และ 71.05 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของ rutin ทั้งหมดได้เท่ากับ 24.70, 44.68 และ 85.45 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยพบปริมาณ rutin จากการวิเคราะห์เท่ากับ 10.12, 30.09 และ 70.86 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อนำมาคำนวณหา %recovery $\pm$ %RSD พบว่ามีค่า 99.23 $\pm$ 0.45, 98.83 $\pm$ 0.88 และ 99.74 $\pm$ 0.58 ตามลำดับ

ตาราง 33 การศึกษา Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ในสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีเหลือง (BW)

sample rutin ($\mu\text{g/mL}$) (n=3)	total rutin ($\mu\text{g/mL}$)	found ($\mu\text{g/mL}$)	add ($\mu\text{g/mL}$)	%recovery (mean $\pm$ %RSD) (n=3)
11.76 $\pm$ 0.21	21.98	10.21	10.15	100.59 $\pm$ 1.52
	42.17	30.41	30.45	99.86 $\pm$ 1.59
	82.21	70.44	71.05	99.14 $\pm$ 1.28

ตาราง 34 การศึกษา Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ในสารสกัดดอกพญาบาทหลงสีม่วง (BV)

sample rutin ($\mu\text{g/mL}$) (n=3)	total rutin ($\mu\text{g/mL}$)	found ($\mu\text{g/mL}$)	add ($\mu\text{g/mL}$)	%recovery (mean $\pm$ %RSD) (n=3)
14.62 $\pm$ 0.15	24.70	10.12	10.15	99.23 $\pm$ 0.45
	44.68	30.09	30.45	98.83 $\pm$ 0.88
	85.45	70.86	71.05	99.74 $\pm$ 0.58

4.7.2.4 Intra-day precision (repeatability)

จากการทดลองการศึกษา precision ของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง ด้วยวิธี Standard addition พบว่าเมื่อคำนวณ %RSD ได้เท่ากับ 1.52, 1.59 และ 1.28 ตามลำดับ

จากการทดลองการศึกษา precision ของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีม่วง ด้วยวิธี standard addition พบว่าเมื่อคำนวณ %RSD ได้เท่ากับ 0.45, 0.88 และ 0.58 ตามลำดับ

ตาราง 35 การศึกษา Intra-day precision ของวิธีวิเคราะห์ ของดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW)

ระดับ rutin ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (n=3, %RSD)
10.15	1.52
30.45	1.59
71.05	1.28

ตาราง 36 การศึกษา Intra-day precision ของวิธีวิเคราะห์ ของดอกพญากาหลงสีม่วง

ระดับ rutin ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision (n=3, %RSD)
10.15	0.45
30.45	0.88
71.05	0.58

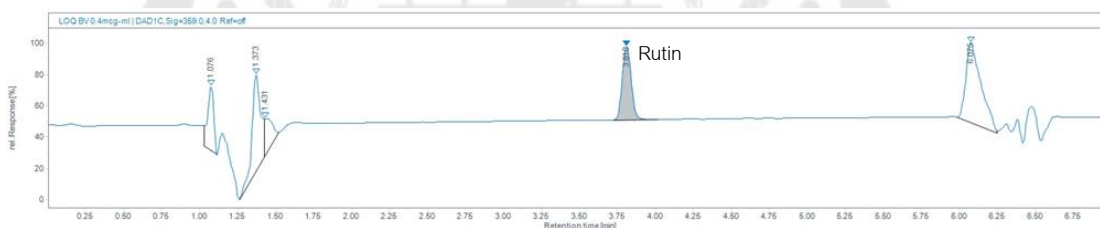
ตาราง 37 แสดงสมการเส้นตรง, ค่า correlation coefficient, LOD, LOQ ของสารมาตรฐาน rutin

Linearity	Equation	Slope	y-intercept	R
1	$y = 12.444x - 1.2367$	12.444	-1.2367	0.9999
2	$y = 12.438x - 1.5508$	12.438	-1.5508	0.9999
3	$y = 12.439x - 0.4866$	12.439	-0.4866	0.9999
Mean		12.44	-1.09	

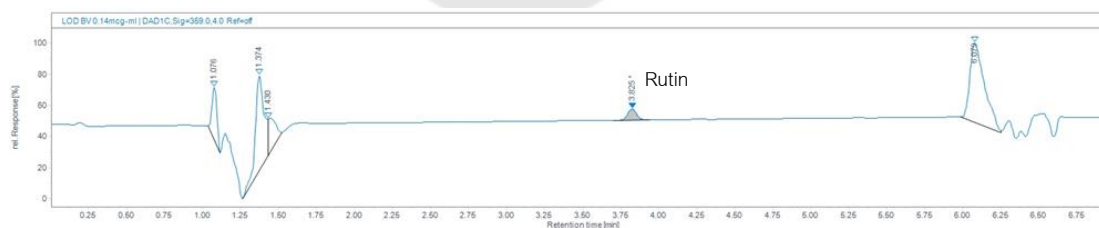
SD	0.00	0.55
LOD	0.15	(µg/mL)
LOQ	0.44	(µg /mL)

4.7.2.5 Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

การคำนวณ LOD และ LOQ ทำโดยการคำนวณค่าความแปรปรวนของค่า y-intercept และ ค่าเฉลี่ยของ slope จากสมการเส้นตรงทั้ง 3 สมการ จากสูตร $LOD = (3.3 \text{ SD}) / (\text{Slope})$ และ $LOQ = (10 \text{ SD}) / (\text{Slope})$ ตามลำดับ ผลการคำนวณทำให้ได้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.15 µg/mL และ 0.44 µg /mL ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองฉีดสารละลาย rutin ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อยืนยัน LOD และ LOQ พบว่าได้ UHPLC chromatogram ตามรูปที่ 10 และ 11 เมื่อพิจารณา peak area ของสารละลาย rutin ที่ความเข้มข้น LOQ 0.44 µg /mL พบว่ามี %RSD เท่ากับ 0.80%



ภาพประกอบ 30 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ rutin ความเข้มข้น 0.15 µg /mL



ภาพประกอบ 31 แสดง UHPLC chromatogram ของสารละลายมาตรฐานของ rutin ความเข้มข้น 0.44 µg /mL

ตาราง 38 แสดง สมการเส้นตรง และค่า correlation coefficient ของสารมาตรฐาน rutin

LOQ			
No.	RT (min)	PA (mAU.s)	conc. (µg/mL)
1	3.810	16.450	1.410
2	3.808	16.842	1.442
3	3.807	16.538	1.417
4	3.805	16.751	1.434
5	3.808	16.534	1.417
6	3.808	16.513	1.415
7	3.808	16.533	1.417
8	3.809	16.517	1.415
9	3.810	16.448	1.410
10	3.810	16.455	1.410
Mean	3.81	16.56	
SD	0.00	0.13	
%RSD	0.04	0.80	

4.8 การวิเคราะห์การหาปริมาณ rutin ในสารสกัดจากดอกพญาบาทหลวง

การวิเคราะห์ปริมาณของ rutin ในตัวอย่างสารสกัดจากดอกพญาบาทหลวงสีเหลือง และสีม่วงทำโดยหั่งและละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของ rutin อยู่ภายในช่วงของ สมการเส้นตรงจากแทนค่าความเข้มข้นของ rutin ที่ได้ลงในสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Final conc. (}\mu\text{g/mL)} = \frac{\text{ปริมาณ rutin (}\mu\text{g)}}{5 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$30.652 \mu\text{g/mL} = \frac{\text{ปริมาณ rutin (}\mu\text{g)}}{5 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}$$

$$\text{ปริมาณ rutin (}\mu\text{g)} = 1532.6 \mu\text{g} = 1.5326 \text{ mg}$$

$$\text{ดังนั้น \% rutin ในสารสกัดดอกพญาบาทหลวง} = \frac{1.5326 \text{ mg}}{5.20 \text{ mg}} \times 100 = 29.47\%$$

การวิเคราะห์พบสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีขาวมีปริมาณของ rutin เฉลี่ยเท่ากับ 20.38%w/w และสารสกัดดอกพญาบาทหลวงสีม่วงมีปริมาณของ rutin เฉลี่ยเท่ากับ 29.76%w/w ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์สารตัวอย่างมีความแม่นยำแสดงโดยค่า %RSD เท่ากับ

0.55 และ 1.59 ตามลำดับ จากการทดสอบทางสถิติพบว่าสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง มีปริมาณ rutin มากกว่าสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง และเมื่อนำไปทดสอบทางสถิติพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

ตาราง 39 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในตัวอย่างสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW)

Sample	weight (mg)	retention time (min)	Peak area (mAU.s)	conc. ($\mu\text{g/mL}$)	μg of rutin	%rutin
1	5.32	3.927	267.45	21.587	1079.30	20.29
2	5.39	3.929	271.752	21.933	1096.63	20.35
3	5.35	3.925	271.84	21.940	1097.00	20.50
					Mean	20.38
					SD	0.11
					%RSD	0.55

ตาราง 40 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ในตัวอย่างสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV)

Samples	weight (mg)	retention time (min)	Peak area (mAU.s)	conc. ($\mu\text{g/mL}$)	μg of rutin	%rutin
1	5.20	3.804	380.22	30.65	1532.61	29.47
2	5.03	3.801	368.10	29.68	1483.88	29.50
3	5.26	3.798	395.54	31.88	1594.18	30.31
					Mean	29.76
					SD	0.47
					%RSD	1.59

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

พญากาหลงเป็นสมุนไพรที่เป็นแหล่งของสารสำคัญที่มีประโยชน์ทางเภสัชวิทยา จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากรากและใบของต้นพญากาหลง (*Bauhinia tomentosa* L.) มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง และสมานแผล งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกพญากาหลงโดยเปรียบเทียบระหว่างดอกสีขาวและสีม่วง โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส องค์ประกอบของสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงด้วยเทคนิค UHPLC-UV-MS

สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงที่สกัดด้วย 80% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:20 พบว่าปริมาณสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมี %yield ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 28.8 และ 33.3% ตามลำดับ สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม ชื่น และหนืด

เมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงด้วยวิธี DPPH Scavenging assay พบว่า สารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 13.30 ± 0.42 , 51.31 ± 3.15 , 45.48 ± 5.24 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ได้มากกว่า สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

เมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay พบว่า สารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.65 ± 0.31 , 27.33 ± 0.92 , 16.02 ± 0.55 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ได้มากกว่า สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงด้วยวิธี FRAP assay พบว่า สารมาตรฐาน rutin สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมีค่า Ferrous sulfate equivalent เท่ากับ 721.500 ± 39.472 , 100.621 ± 6.149 และ 132.325 ± 5.574 $\text{mmol}/100\text{g extract}$ ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ได้มากกว่า สารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p=0.05$) จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าสารสกัด

ดอกพญาภากาหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยกลไกการต้านอนุมูลอิสระและการให้อิเล็กทรอนิกส์

สารสกัดดอกพญาภากาหลงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารสกัดดอกพญาภากาหลงสีม่วงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 93.36 ± 2.73 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดดอกพญาภากาหลงสีเหลือง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.67 ± 11.59 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน kojic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.76 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$ แต่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกพญาภากาหลงสีเหลืองและสีม่วง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$)

ตาราง 41 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารมาตรฐาน rutin สกัดดอกพญาภากาหลงสีเหลือง (BW) และสกัดดอกพญาภากาหลงสีม่วง (BV) ($n=3$)

Compounds	Bioassay (mean $\pm$ SD; $n = 3$)			
	DPPH	ABTS	FRAP	Anti-tyrosinase
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	FeSO_4 equivalent (mmol/100g)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Rutin	13.30 ± 0.42	7.65 ± 0.31	721.50 ± 39.47	
BW	51.31 ± 3.15	27.33 ± 0.92	100.62 ± 6.15	117.67 ± 11.59
BV	45.48 ± 5.24	16.02 ± 0.55	132.32 ± 5.57	95.35 ± 2.71
<i>p</i> -value by t-test at 95%CI	0.060	0.006*	0.030*	0.098

* significant at p -value < 0.05

จากการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method และปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation พบว่า สารสกัดดอกพญาภากาหลงสีเหลืองมีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกไม่แตกต่างจากสารสกัดดอกพญาภากาหลงสีม่วง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) โดยสารสกัดดอกพญาภากาหลงสีเหลืองและสีม่วงมีค่าของปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมดเท่ากับ 18.13 ± 0.19 และ 18.01 ± 0.7 mg of gallic acid/g of

extracts สารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์มากกว่าในสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) โดยสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองมีค่าปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์เท่ากับ 76.7002 ± 0.74 mg of quercetin/g of extracts และสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีค่าปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์เท่ากับ 97.2056 ± 0.06 mg of quercetin/g of extracts

จากการที่นำสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงไปทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมี เพื่อเปรียบเทียบระหว่างดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงพบว่า ในการศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assay สารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation ที่ได้ว่าสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วงมีปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) จึงนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบหาชนิดของสารสำคัญด้วยวิธี UHPLC-UV-MS

ตาราง 42 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสกัดดอกพญากาหลงสีเหลือง (BW) และสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง (BV) (n=3)

Phytochemical content (mean $\pm$ SD; n=3)		
Compounds	Total phenolic content	Total flavonoid content
	(Gallic acid equivalent	(quercetin equivalent
	mg/g)	mg/g)
BW	18.13 $\pm$ 0.19	76.70 $\pm$ 0.74
BV	18.01 $\pm$ 0.17	97.21 $\pm$ 0.06
<i>p</i> -value by t-test at 95%CI	0.410	0.000*

* significant at p -value <0.05

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC-UV-MS ในการทดลองนี้ได้ใช้สารมาตรฐานจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ gallic acid, chlorogenic acid, Ideain chloride, ellagic acid, rutin, isoquercetin, และ quercetin โดยพบว่า retention time มีค่าเท่ากับ 2.530, 9.143, 10.510, 21.314, 21.521, 22.454 และ 35.318 นาที ตามลำดับ เมื่อฉีดสารละลายตัวอย่าง BW, BV พบว่ามีค่า retention time

เท่ากับ 21.628 และ 21.618 นาที ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการตรวจวัดด้วย Mass ในโหมดประจุลบ พบว่ามีมวลโมเลกุลหลักเท่ากับ 609.2 ซึ่งค่า retention time และค่ามวลโมเลกุลหลักนี้มีค่าตรงกับสารมาตรฐาน rutin จึงสรุปได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงเป็น rutin นอกจากนี้การวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ไม่ปรากฏพิกของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ rutin ด้วยเทคนิค UHPLC-UV ได้ทำการปรับระยะเวลาการวิเคราะห์ให้เร็วขึ้นด้วยการเพิ่มสัดส่วนของ acetonitrile เป็นระบบ gradient elution ด้วยการวิเคราะห์ rutin ภายในระยะเวลา 7 นาที ในช่วงเริ่มต้น 0-5 นาที สัดส่วนของ Acetonitrile เพิ่มจาก 15% เป็น 27.5% เพื่อแยกสาร rutin ที่มีในสารสกัด ในช่วงกลาง 5-6 นาที สัดส่วนของ Acetonitrile เพิ่มจาก 27.5% เป็น 100% เพื่อทำการชะสารที่เหลือออกจาก column และในช่วงท้าย 6.01-7 นาที สัดส่วนของ acetonitrile ลดจาก 100% เป็น 15% เพื่อ re-equilibrate column จากนั้นทำการศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ต่อ rutin โดยใช้สารละลายมาตรฐาน isoquercetin, Quercetin, และสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง โดยพบว่า retention time ของ rutin, isoquercetin, quercetin เท่ากับ 3.694, 4.219 และ 6.163 นาที ทั้งนี้ peak purity ของ rutin ในสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง เท่ากับ 999.99, 999.98 และ 999.86 ตามลำดับ ทั้งนี้สารละลายสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง มี rutin ที่ retention time เท่ากัน คือ 3.801 นาที จึงสรุปได้ว่าสารสำคัญของสารสกัดดอกพญากาหลงคือ rutin ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อวัดปริมาณ rutin ด้วยวิธี UHPLC-UV และสามารถนำไปใช้กับการวัดปริมาณ rutin ในสารสกัดดอกพญากาหลงได้

วิธีวิเคราะห์เพื่อวัดหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดด้วยวิธี UHPLC-UV เป็นวิธีที่แพร่หลาย มีความถูกต้องและแม่นยำ สามารถนำไปใช้กับการวัดปริมาณ rutin ในสารสกัดดอกพญากาหลงได้ จากการศึกษา system suitability ของวิธีวิเคราะห์ต่อสาร rutin ในสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง พบว่าระบบมีความเหมาะสมในการศึกษา เนื่องจากบันทึกค่า capacity factor, tailing factor และ number of theoretical plates ของสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองเท่ากับ 3.325, 1.403 และ 28492.426 ของสารละลายสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง เท่ากับ 1.768, 1.013 และ 13156.213 ตามลำดับ

จากการศึกษา Linearity โดยสร้างสมการเส้นตรงที่มีความสัมพันธ์ระหว่าง peak area กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน rutin 6 ความเข้มข้น ซึ่งมีความเข้มข้น 10.15-101.5 µg/mL ได้สมการเส้นตรง $y = 12.44x + 1.0913$ และมีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9999 ซึ่งมีค่า

มากกว่า 0.99

จากการทดลองการศึกษา Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง ด้วยวิธี Standard addition เมื่อนำมาคำนวณหา %recovery±%RSD พบว่ามีค่า 100.59±1.52, 99.86±1.59 และ 99.14±1.28 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดดอกพญากาหลงสีม่วง นำมาคำนวณหา %recovery±%RSD พบว่ามีค่า 99.23±0.45, 98.83±0.88 และ 99.74±0.58 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามที่กำหนดใน AOAC Guideline ที่ 98 -102%

จากการศึกษา precision ของวิธีวิเคราะห์ rutin ในจากการทดลองการศึกษา precision ของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง ด้วยวิธี standard addition พบว่าเมื่อคำนวณ %RSD ที่ $\leq 1.9\%$ โดยการศึกษา accuracy และ precision ของวิธีวิเคราะห์ rutin ในสารสกัดจากสารสกัดจากดอกพญากาหลงด้วยวิธี standard addition ซึ่งมีค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามที่กำหนดใน AOAC Guideline

การวิเคราะห์การหาปริมาณ rutin ในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วง พบว่าสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองเท่ากับ 20.38±0.11% และในสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีม่วง 29.76±0.47% ทั้งนี้พบว่าสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีม่วงมีปริมาณของ rutin มากกว่าสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลือง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$)

เมื่อคำนวณปริมาณของ rutin ในดอกพญากาหลงสีเหลืองพบว่ามีปริมาณของ rutin เท่ากับ 5.869% ในขณะที่ดอกพญากาหลงสีม่วงพบว่ามีปริมาณของ rutin เท่ากับ 9.919% ซึ่งปริมาณของ rutin ในดอกพญากาหลงสีเหลืองที่ได้จากการทดลองนี้พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบปริมาณของ rutin เท่ากับ 4.6% rutin เป็นสารในกลุ่ม flavonol ที่พบหลักในสารสกัดดอกพญากาหลงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ rutin ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบที่เกิดจากรังสี การสร้างกระดูกผ่านกลไกการกระตุ้น osteoblast การลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด การลดความดัน การปกป้องเซลล์ประสาท การป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Lobo et al., 2010) หากนำสารสกัดจากดอกพญากาหลงมาใช้ประโยชน์ทางยาและเครื่องสำอางโดยมุ่งเน้นที่ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ rutin ทางคณะผู้วิจัยแนะนำให้ใช้สารสกัดจากดอกพญากาหลงสีม่วงเนื่องจากมีปริมาณของ rutin ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าสารสกัดจากดอกพญากาหลงสีเหลืองอย่างมีนัยสำคัญ

เนื่องด้วยงานศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาสารในกลุ่ม anthocyanins ในสารสกัดของดอกพญากาหลงสีเหลืองและสีม่วงที่สกัดด้วย 80% เอทานอลด้วยเทคนิค UHPLC-UV-MS ผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏพีคของสารในกลุ่ม anthocyanins ที่ความยาวคลื่น 520 nm ทั้งนี้อาจเกิด

เนื่องจากสารในกลุ่ม anthocyanins อาจมีความไม่คงตัว (Enaru & Pop, 2021) โดยสารสกัดที่ใช้ในการศึกษามีอายุมากกว่า 6 เดือน ทั้งนี้สารในกลุ่ม anthocyanins จะมีความไวต่อ pH และความร้อน หากต้องการทำการศึกษาปริมาณสาร anthocyanins ในสารสกัดของดอกพญาทาลองสีเหลืองและสีม่วงควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นกรด เพื่อช่วยเพิ่มการละลายและความคงสภาพของสารในกลุ่ม anthocyanins และทำการศึกษานหลังจากสกัดทันที



บรรณานุกรม

- Agustin-Salazar, S., Medina-Juárez, L. A., Soto-Valdez, H., Manzanares-López, F., & Gámez-Meza, N. (2014). Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(2), 208-213.
<https://doi.org/10.1111/ajgw.12063>
- AOAC. (2016). *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Retrieved 18 Jan from https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf
- BioRender.com. (2024). Mass Spectrometry (MS)- Principle, Working, Parts, Steps, Uses. In: March 4, 2022.
- Chaikhong, K., Chumpolphant, S., Rangsinth, P., Sillapachaiyaporn, C., Chuchawankul, S., Tencomnao, T., & Prasansuklab, A. (2023). Antioxidant and Anti-Skin Aging Potential of Selected Thai Plants: In Vitro Evaluation and In Silico Target Prediction. *Plants*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/plants12010065>
- Chatatikun, M., Tedasen, A., Pattarangoon, N. C., Palachum, W., Chuaijit, S., Mudpan, A., Pruksaphanrat, S., Sohbenalee, S., Yamasaki, K., & Klangbud, W. K. (2023). Antioxidant activity, anti-tyrosinase activity, molecular docking studies, and molecular dynamic simulation of active compounds found in nipa palm vinegar. *PeerJ*, 11. <https://doi.org/10.7717/peerj.16494>
- Enaru, B. D., canu, G., & Pop, T. D. S. a., A.; Diaconeasa, Z. ~. (2021). Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation. *Antioxidants*, 10(12), 1967.
<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/12/1967>
- Kwankhao, P., Chuthaputti, A., Tantipidok, Y., Pathomwichaiwat, T., Theantawee, W., Buabao, S., Chantraket, R., Puttarak, P., Petrakart, P., Chinsoi, P., Chungsiriporn, D., Bongcheewin, B., & Sermsinsiri, V. (2020). The Current Situation of the Herbal Medicinal Product System in Thailand. *Journal of Health Science*, 29, 82-95.

- Li, Y. Q., Zhou, F. C., Gao, F., Bian, J. S., & Shan, F. (2009). Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), 11463-11468.
<https://doi.org/10.1021/jf903083h>
- Liu, J. H., Cheng, Y. A.-O., Hsieh, C. H., & Tsai, T. A.-O. (2017). Identification of a Multicomponent Traditional Herbal Medicine by HPLC-MS and Electron and Light Microscopy. LID - 10.3390/molecules22122242 [doi] LID - 2242. (1420-3049 (Electronic)).
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-126.
<https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Nallabattini, V., Kuttiappan, A., & Kasimedu, S. (2014). BAUHINIA TOMENTOSA: A REVIEW. *Anitha Kuttiappan / J Compr Phar*, 2(1), 27-30. www.jcponline.in
- Patel, K., & Patel, D. K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (pp. 457-479). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813820-5.00026-x>
- Ribeiro, A. S., Estanqueiro, M., Oliveira, M. B., & Lobo, J. M. S. (2015). Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. In *Cosmetics* (Vol. 2, pp. 48-65): MDPI AG.
- Samaneh Z., Asieh B., Mahmud Tareq H. K., Munoz-Munoz J., Garcia-Molina F., Garcia-Canovas F., & Ali Akbar S. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. In *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Vol. 34, pp. 279-309): Taylor and Francis Ltd.
- Shimadzu. (2024). What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ? . In.
- Thetsana, P., Palanuvej, C., & Ruangrunsi, N. RP-HPLC Preliminary Analysis of Quercetin and Quercitrin Contents in Bauhinia spp. Leaves Distributed in Thailand. *Thai*

Pharmaceutical and Health Science Journal, 16(2), 164-167.

<http://ejournals.swu.ac.th/index.php/pharm/index>

Wikipedia. (2024a). Isoquercetin. In.

Wikipedia. (2024b). Quercetin. In.

Wikipedia. (2024c). Rutin. In.

Wong, S. K., Lim, Y. Y., & Chan, E. W. C. (2009). ANTIOXIDANT PROPERTIES OF HIBISCUS: SPECIES VARIATION, ALTITUDINAL CHANGE, COASTAL INFLUENCE AND FLORAL COLOUR CHANGE. *Journal of Tropical Forest Science*, 21(4), 307-315. <http://www.jstor.org/stable/23616755>





ภาคผนวก

ตาราง 43 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay

	Variable 1	Variable 2
Mean	51.30562	45.48219
Variance	9.965117	27.50163
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	3	
t Stat	1.647847	
P(T<=t) one-tail	0.098971	
t Critical one-tail	2.353363	
P(T<=t) two-tail	0.197942	
t Critical two-tail	3.182446	

ตาราง 44 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

	Variable 1	Variable 2
Mean	27.32681277	16.02227233
Variance	0.854687777	0.307158722
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	3	
t Stat	18.16515727	
P(T<=t) one-tail	0.000181972	
t Critical one-tail	2.353363435	
P(T<=t) two-tail	0.000363945	
t Critical two-tail	3.182446305	

ตาราง 45 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP assay)

	Variable 1	Variable 2
Mean	100.6207456	132.3249444
Variance	37.80752735	31.06629386
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	-6.616835242	
P(T<=t) one-tail	0.001352458	
t Critical one-tail	2.131846786	
P(T<=t) two-tail	0.002704916	
t Critical two-tail	2.776445105	

ตาราง 46 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Mushroom tyrosinase inhibitory assay

	Variable 1	Variable 2
Mean	117.6690831	93.35754796
Variance	134.3639794	7.448487753
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	3.536028881	
P(T<=t) one-tail	0.035752692	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.071505383	
t Critical two-tail	4.30265273	

ตาราง 47 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
ของปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method

	Variable 1	Variable 2
Mean	18.13191109	18.01465666
Variance	0.035090717	0.027606696
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	0.811082628	
P(T<=t) one-tail	0.231409599	
t Critical one-tail	2.131846786	
P(T<=t) two-tail	0.462819198	
t Critical two-tail	2.776445105	

ตาราง 48 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
ของปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation

	Variable 1	Variable 2
Mean	76.70024581	97.20564893
Variance	0.543265039	0.003296087
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	-48.04072685	
P(T<=t) one-tail	0.000216505	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.000433011	
t Critical two-tail	4.30265273	

ตาราง 49 การทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances
ของการวิเคราะห์การหาปริมาณ rutin ในสารสกัดจากดอกพญาบาทหลงสีเหลือง (BW) และสีม่วง
(BV)

	Variance 1	Variance 2
Mean	20.425	29.905
Variance	0.01125	0.32805
Observations	2	2
Hypothesized Mean Difference	0	
df	1	
t Stat	-23.01608249	
P(T<=t) one-tail	0.013821197	
t Critical one-tail	6.313751515	
P(T<=t) two-tail	0.027642395	
t Critical two-tail	12.70620474	

ประวัติผู้เขียน

