

ฟลาโวนอยด์ : สารต้านอนุมูลอิสระจากดาวเรือง Flavonoids : Antioxidant Compounds from Marigold

กาญจนา วงศ์กระจ่าง¹ นันทวัน ปานอ่วม²

^{1,2} อาจารย์ประจำ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

บทคัดย่อ

สารฟลาโวนอยด์แยกได้จากสารสกัดเอทานอลของดอกดาวเรืองโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี คือ quercetagenin glucoside และ quercetagenin นอกจากนี้ยังพบสารที่มีปริมาณมากคือ β -amyrin เป็นสารกลุ่มไตรเทอปีน และ β -sitosterol glucoside เป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ สารที่แยกได้ทั้งหมดพิสูจน์โดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพและข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ IR, NMR และ MS ตลอดจนเทียบจากข้อมูลที่เผยแพร่ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ผลการทดสอบของสารสกัดหยาบ สารกลุ่มต่างๆที่แยกจากสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ กลุ่มที่มีขั้วสูง พบว่า แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และ quercetagenin แสดงฤทธิ์ที่ดีมีค่า IC_{50} 13.60 ± 0.32 และ 26.54 ± 1.74 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (Gallic acid, $IC_{50} = 21.21 \pm 0.34$ $\mu\text{g/ml}$)

คำสำคัญ

ดาวเรือง, ฟลาโวนอยด์, สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Flavonoid compounds from ethanol extract of the Marigold flower were isolated by using column chromatography were quercetagenin glucoside and quercetagenin in addition also included a triterpenoid compound; β -amyrin and steroid compound; β -sitosterol glucoside were isolated in a large quantity. The structure elucidation of isolated compounds were achieved by the basis of physical properties and spectroscopic techniques such as UV, IR, NMR and MS as well as compared with the literature report. The anti-oxidant evaluation using DPPH assay of the crude extract and the isolated compound found that polar group exhibited the most highly activity and quercetagenin exhibited the highly activity with IC_{50} 13.60 ± 0.32 and 26.54 ± 1.74 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Gallic acid, $IC_{50} = 21.21 \pm 0.34$ $\mu\text{g/ml}$)

Keywords

Tagetes Erecta, Flavonoid, Antioxidant

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ดาวเรือง มีชื่อสามัญ Marigold และชื่อวิทยาศาสตร์ *Tagetes erecta* L. อยู่ในวงศ์ COMPOSITAE ประโยชน์ของดอกดาวเรืองที่น่าสนใจคือใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ในดอกดาวเรืองมีสารหลายกลุ่ม เช่น สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ (Xu, 2012,103-117) ซึ่งสาร 2 กลุ่มนี้เป็นสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

อนุโมลิสระ หมายถึงสารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่ออยู่ในวงรอบของอะตอม หรือโมเลกุล อนุโมลิสระที่มากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะ low density lipoprotein) โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม DNA และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว Alzheimer's disease หรือโรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่และโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็งบางชนิด เป็นต้น (Bagchi, 1998, pp. 350-360) อนุโมลิสระเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง

ในปัจจุบันยารักษาโรคมะเร็งยังคงมีราคาแพง และวิธีการบำบัดผู้ป่วยด้วยสารเคมี ก่อให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ การศึกษาฤทธิ์ต่อต้านอนุโมลิสระอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้อย่างหนึ่งถึงคุณสมบัติในการต่อต้านโรคมะเร็งได้ จากการศึกษพบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีสรรพคุณหลายด้าน เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเบาหวานและโรคความจำเสื่อม (Denny, 2013)

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องของดาวเรือง พบว่าดอกดาวเรืองมีสารหลายกลุ่ม (Xu, 2012, 103-117) (Hamburger, 2003, 328) (Maity, 2011, 1300) (Irene, 2005, 2356-62) แต่ในประเทศไทยส่วนใหญ่ศึกษาสารสกัดเท่านั้นไม่ได้ศึกษาสารบริสุทธิ์ และพืชแต่ละแหล่งมีสารที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษารัสนี้สนใจศึกษาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุโมลิสระของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดอกดาวเรือง จ. พิษณุโลก จากผลการวิจัยนี้จะนำสารฟลาโวนอยด์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะนำไปบูรณาการกับการเรียนการสอนและการบริการวิชาการและอาจนำไปสู่การนำสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ได้มาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและเป็นอาหารเสริมที่ช่วยเสริมสร้างสุขภาพและป้องกันโรคมะเร็งในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta*) สายพันธุ์จังหวัดพิษณุโลก
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุโมลิสระของกลุ่มสารและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดอกดาวเรือง

(*Tagetes erecta*) สายพันธุ์จังหวัดพิษณุโลก

ขอบเขตการวิจัย

ขอบด้านเนื้อหา

1. การสกัดและแยกสารจากดอกดาวเรืองด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี
2. พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุโมลิสระของกลุ่มสารและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ขอบเขตด้านตัวแปร

1. องค์ประกอบทางเคมีของดอกดาวเรืองสายพันธุ์จังหวัดพิษณุโลก
2. สารต้านอนุโมลิสระจากดอกดาวเรืองสายพันธุ์จังหวัดพิษณุโลก

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดอกดาวเรือง กลุ่มผู้ผลิตไม้ดอกไม้ประดับ บ้านคลองวัดไร่ ต.บางระกำ อ.บางระกำ จ.พิษณุโลก

สารเคมี

เอทานอล, เอทิลอะซิเตท, ไดคลอโรมีเทน, เฮกเซน, ซิลิกา เจล, (Merck silica gel 60, 0.063-0.200 mm) 4-Methoxy benzaldehyde, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Gallic acid, TLC plate

เครื่องมือ

Rotary Evaporator, Nuclear magnetic resonance spectrometer (NMR) 400 MHz, FT-IR Spectrometer, Mass spectrometer และ Microplate reader

วิธีการทดลอง

1. การสกัดสารจากดอกดาวเรืองแบบแช่หมัก (Maceration)

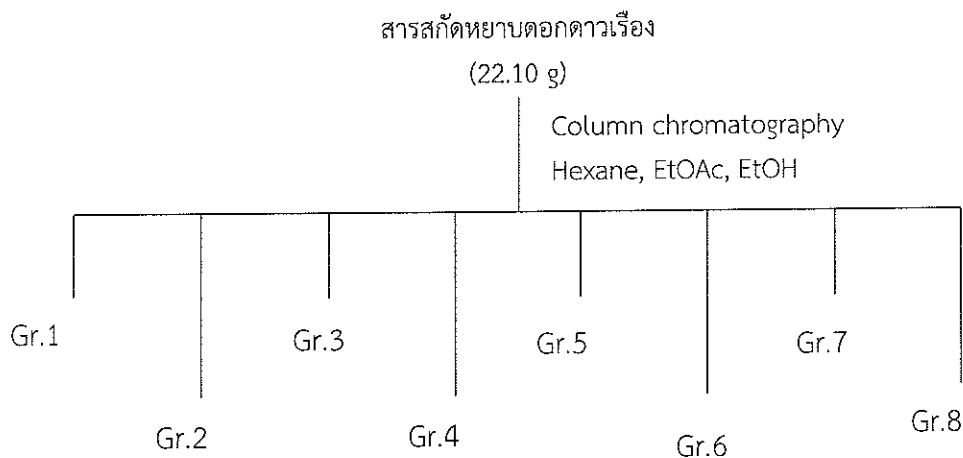
นำดอกดาวเรืองสด 10.08 กิโลกรัม และกลีบดอกแยกออกจากฐานรองดอก ทำให้กลีบดอกให้เล็กแล้วล้างที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน ได้ดอกดาวเรืองแห้ง 540 กรัม นำผงดอกดาวเรืองแห้ง ใส่ถุงผ้าฝ้าย แช่ด้วย 95% เอทานอล 5 ลิตร แช่ไว้ในถังอลูมิเนียมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง ทำการระเหยเอทานอลด้วยเครื่องกลั่นแยกสาร (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดดอกดาวเรือง มีสีน้ำตาลเข้ม หนืด มีกลิ่นเหมือนน้ำผึ้ง โดยน้ำหนักสารที่ได้ทั้งหมด 72.05 กรัม คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักของดอกดาวเรืองแห้ง คือ ร้อยละ 13.33

2. การแบ่งกลุ่มสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การแบ่งกลุ่มสารจากสารสกัดหยาบเอทานอลของดอกดาวเรืองโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทำโดยแบ่งสารสกัดมา 22.10 กรัม เฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล และเฟสเคลื่อนที่ เริ่มจากเฮกเซน ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วต่ำที่สุด และเพิ่มความมีขั้วด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทานอลตามลำดับ

การตรวจสอบเพื่อแบ่งสารออกเป็นกลุ่ม ๆ หลังจากแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เทคนิคThin Layer Chromatography ทำโดยใช้แผ่น TLC สำเร็จรูป ซึ่งเป็น silica gel เคลือบบนแผ่นอลูมิเนียมเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือตัวทำละลายผสม ระหว่าง เฮกเซน กับ เอทิลอะซิเตท และเอทิลอะซิเตทกับ เอทานอล ตรวจวัดสารที่แยกได้โดยแสงยูวี โดยใช้ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm และสารละลายแอนิแซลดีไฮด์ (0.5% p-anisaldehyde/EtOH + 5% H₂SO₄) โดยให้ความร้อน 105 °C เป็นเวลา 1-3 นาที

จากการตรวจสอบสารแต่ละส่วนที่แยกจากคอลัมน์ด้วย TLC ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มสารสกัดของดอกดาวเรือง เป็น 8 กลุ่ม (ดังแผนผังที่ 1) ได้น้ำหนักรวม 5.2328 g คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักของดอกดาวเรืองแห้ง คือ ร้อยละ 23.71



Gr.1, fractions 1-6 (756.5 mg)

Gr.5, fractions 25-30 (430.0 mg)

Gr.2, fractions 7-12 (1732.8 mg)

Gr.6, fractions 31-36 (90.7 mg)

Gr.3, fractions 13-18 (147.2 mg)

Gr.7, fractions 37-42 (53.5 mg)

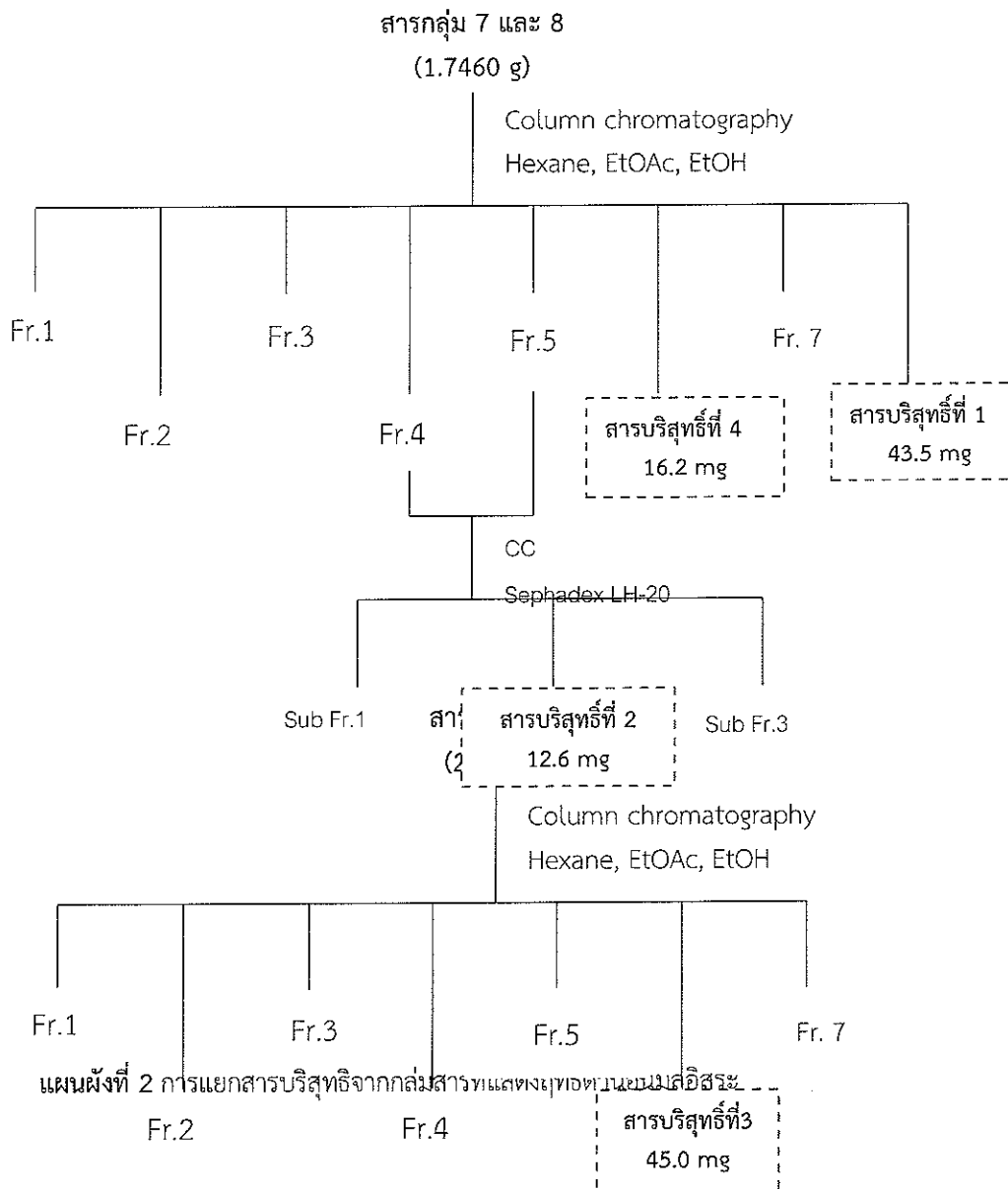
Gr.4, fractions 19-24 (329.1 mg)

Gr.8, fractions 43-49 (1693.0 mg)

แผนผังที่ 1 การแบ่งกลุ่มสารจากสารสกัดหยาดเอทานอลของดอกดาวเรือง

3. การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

นำกลุ่มสารที่แยกได้ทีแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือ กลุ่ม 3, 7 และ 8 มาแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล และsephadex LH-20 ส่วนเฟสเคลื่อนที่คือ เฮกเซน เมทิลีนคลอไรด์, เอทิลอะซิเตท และ เอทานอล ได้สารบริสุทธิ์ 4 ชนิด ดังแสดงในแผนผังที่ 2



แผนผังที่ 2 การแยกสารบริสุทธิ์จากกลุ่มสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4. การตรวจสอบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

- วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์
- วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่องมือดังนี้
- Ultraviolet-Visible spectrophotometer
- Infrared spectrophotometer
- วิเคราะห์หาโครงสร้างโมเลกุลด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์

โดยใช้เครื่อง Bruker DRX-400 ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลดังนี้

- The ^1H - NMR spectral data
- ^{13}C - NMR spectral data
- DEPT, ^1H -COSY NMR spectral data
- HMQC NMR spectral data
- HMBC NMR spectral data
- วิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสารบริสุทธิ์

Electro spray-ionization mass spectrometry (ESI- MS)

โดยใช้เครื่อง Mass spectrometer

5. การทดสอบฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ด้วย DPPH assay

- 1) เตรียม DPPH stock solution ที่ความเข้มข้น $163\ \mu\text{M}$ ใน ethanol AR grade (ซึ่ง DPPH น้ำหนัก 3.26 มิลลิกรัม ปริมาตรเป็น 50 มิลลิตร)
- 2) เตรียม DPPH working solution เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7-0.9 ด้วย ethanol AR grade
- 3) เตรียม Gallic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ ที่ความเข้มข้นตามต้องการเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ควรทำอย่างน้อย 5 ความเข้มข้นขึ้นไป
- 4) เตรียมตัวอย่างสารสกัดโดยชั่งตัวอย่างสารสกัดประมาณ 10 mg ละลายด้วย ethanol ปริมาตร 1 ml จากนั้นเจือจางสารตัวอย่างด้วย ethanol ให้มีความเข้มข้นจำนวน 7 ระดับความเข้มข้น (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 และ 0.156 mg/ml ตามลำดับ)
- 5) ทดสอบฤทธิ์ในการกำจัด hydrogen radicals ของตัวอย่างสารสกัด โดยวัดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีจากสี ม่วง ของ DPPH solution เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (reduced form) โดย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 nm เติมสารดังตาราง 1 ลงใน U-shaped microplate จากนั้นเขย่าเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

	DPPH working solution (μL)	ethanol (μL)	sample (μL)
Sample blank	-	180	20
Test sample	180	-	20
Positive control	180	20	-
Negative control	-	200	-

วัดค่าการดูดกลืนแสงของ reaction mixture โดยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm.

6) คำนวณหา % inhibition ตามสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(A_{\text{Pos}} - A_{\text{Neg}}) - (A_{\text{Test}} - A_{\text{Blk}})]}{(A_{\text{Pos}} - A_{\text{Neg}})} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis) การทดสอบตัวอย่างๆ ละ 3 ครั้งในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอล สามารถนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm$ SD)

ผลการวิจัย

1. การแบ่งกลุ่มสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

โดยแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันตามความมีขี้ โดยกลุ่ม 1-3 เป็นกลุ่มที่มีความมีขี้ต่ำ โดยตัวทำละลายที่ใช้คือสารผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตท (เฮกเซน – 50 % เอทิลอะซิเตท) กลุ่มสารส่วนใหญ่คือ กรดไขมัน น้ำมันหอมระเหย เป็นสารที่มีกลิ่น ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิปกติ สารมีสีเหลืองส้มส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแคโรทีนอยด์ กลุ่ม 4-6 เป็นกลุ่มที่มีความมีขี้ปานกลาง โดยตัวทำละลายที่ใช้คือสารผสมระหว่างเฮกเซน กับ เอทิลอะซิเตท (60 % เอทิลอะซิเตท- 90 %เอทิลอะซิเตท) กลุ่มสารคาดว่าน่าจะเป็นสารประกอบไตรเทอร์ปีนและฟีนอลิก เนื่องจากการตรวจสอบโดยส่องผ่านแสง UV โดยใช้ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm ให้ผลที่เป็นบวก ส่วนกลุ่ม 7-8 เป็นกลุ่มที่มีความมีขี้สูง โดยตัวทำละลายที่ใช้คือสารผสมระหว่างเอทิลอะซิเตท กับเอทานอล (100 % เอทิลอะซิเตท – 50 % เอทานอล) คาดว่าจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์และสารประกอบไกลโคไซด์ สำหรับสารในดอกดาวเรืองน่าจะเป็น ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ เนื่องจากข้อมูลที่เคยรายงานและการตรวจสอบโดยส่องผ่านแสง UV โดยใช้ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm ให้ผลที่เป็นบวก

2. ผลการแยกสารบริสุทธิ์และการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์

จากการทดลองสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 4 ชนิด (1-4) มีน้ำหนัก 43.5, 12.6, 45.0 และ 16.2 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 1.97, 0.57, 2.04 และ 0.73 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโมเลกุล มีรายละเอียดดังนี้

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์

สารสกัดดอกดาวเรืองนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 4 ชนิด คือ quercetagenin glucoside (1), quercetagenin (2), β -amyrin (3) และ β -sitosterol glucoside (4) ได้วิเคราะห์จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ เทียบจากสารมาตรฐานและเปรียบเทียบยืนยันสูตรโครงสร้างจากข้อมูลที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว ปรากฏผลการทดลองดังนี้

สารบริสุทธิ์ที่ 1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีสูตรทั่วไปที่ยืนยันจากข้อมูลของ ESMS (-ve) : m/z (% rel.intensity) 479 [M-1]⁻ (100) คือ C₂₁H₂₀O₁₃ สำหรับข้อมูลจาก IR สเปกตรัม แสดงสัญญาณที่ความถี่ (γ_{max}) ต่างๆดังนี้ ความถี่ 3398 cm⁻¹ (การสั่นแบบยืดของหมู่ O-H) ความถี่ 1506 cm⁻¹ (การสั่นแบบยืดของพันธะ C=C ในโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติก) ความถี่ 1653 cm⁻¹ (การสั่นแบบยืดของพันธะ α,β -Unsaturated ketone) ส่วนข้อมูลของ UV แสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 254 นาโนเมตร ข้อมูล 1D และ 2D NMR ทำให้ทราบโครงสร้างสาร (¹H-NMR แสดงในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ 2 ที่ 400 MHz ในสารละลาย DMSO-d_6 (ค่า δ มีหน่วยเป็น ppm, ค่า J มีหน่วยเป็น Hz)

ตำแหน่ง	Quercetagenin glucoside δ ของ $^1\text{H-NMR}$ (ppm)
H-C- 8	6.90 (s)
H-C- 2'	7.51 (d, $J=8.3$ Hz)
H-C- 3'	6.86 (d, $J=8.3$ Hz)
H-C- 6'	7.68 (s)
HO-C- 3	9.39 (s)
HO-C- 5 (H-bond)	12.23 (s)
HO-C- 6	8.52 (s)
HO-C- 4'	9.32 (s)
HO-C- 5'	9.70 (s)
H-C- 1''	4.99 (d, $J=6.6$ Hz)
H-C- 2''	3.18-3.71
H-C- 3''	3.18-3.71
H-C- 4''	3.18-3.71
H-C- 5''	3.18-3.71
H-C- 6''	3.18-3.71
HO-C- 2''	5.45 (br s)
HO-C- 3''	5.19 (br s)
HO-C- 4''	5.15 (br d)
HO-C- 6''	4.72 (br t)

สารบริสุทธิ์ที่ 2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีสูตรทั่วไปที่ยืนยันจากข้อมูลของ ESMS (-ve) : m/z (% rel.intensity) 317 $[\text{M}-1]^-$ (100) คือ $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_8$ สำหรับข้อมูลจาก IR สเปกตรัม แสดงสัญญาณที่ความถี่ (γ_{max}) ต่างๆดังนี้ ความถี่ 3255 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของหมู่ O-H) ความถี่ $1599, 1506\text{ cm}^{-1}$ (การสั่นแบบยืดของพันธะ C=C ในโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติก) ความถี่ 1652 cm^{-1} (การสั่นแบบยืดของพันธะ α,β -Unsaturated ketone) ส่วนข้อมูลของ UV แสดงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 254 นาโนเมตร ข้อมูล NMR แสดงในตารางที่ 3

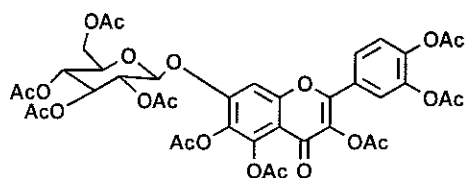
ตารางที่ 3 ค่า $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารบริสุทธิ์ที่ 2 ที่ 400 MHz ในสารละลาย DMSO-d_6 (ค่า δ มีหน่วยเป็น ppm, ค่า J มีหน่วยเป็น Hz)

ตำแหน่ง	Quercetagenin δ ของ $^1\text{H-NMR}$ (ppm)
H-C- 8	7.63 (s)
H-C- 2'	7.51 (d, $J=8.4$ Hz)
H-C- 3'	6.86 (d, $J=8.4$ Hz)
H-C- 6'	6.48 (s)
HO-C- 3	8.70 (s)
HO-C- 5 (H-bond)	12.23 (s)
HO-C- 6	9.32 (s)
HO-C- 7	9.62 (s)
HO-C- 4'	10.57 (s)
HO-C- 5'	9.23 (s)

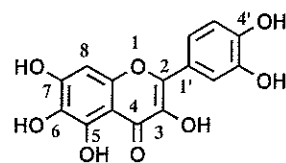
สารบริสุทธิ์ที่ 3 มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปเข็ม ตรวจสอบด้วยเทียบกับสารมาตรฐาน และสารละลาย anisaldehyde และ เปรียบเทียบข้อมูล (Kanjana, 2011, 392-394) $^1\text{H-NMR}$ ตรงกับสาร β -amyrin

สารบริสุทธิ์ที่ 4 มีลักษณะเป็นผลึกใสรูปเข็ม ตรวจสอบด้วยเทียบกับสารมาตรฐาน และสารละลาย anisaldehyde และ เปรียบเทียบข้อมูล (Kanjana, 2011, 429-432) $^1\text{H-NMR}$ ตรงกับสาร β -sitosterol glucoside

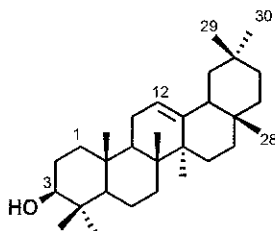
ผลการพิสูจน์โครงสร้างจากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ เทียบจากสารมาตรฐานและ เปรียบเทียบยืนยันสูตรโครงสร้างจากข้อมูลที่ได้รับการเผยแพร่แล้ว มีโครงสร้างดังรูปที่ 1



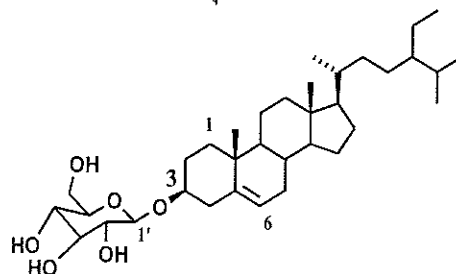
สารบริสุทธิ์ที่ 1



สารบริสุทธิ์ที่ 2



สารบริสุทธิ์ที่ 3



สารบริสุทธิ์ที่ 4

รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดดอกดาวเรือง

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ได้นำสารสกัดหยาบ กลุ่มสารที่แยกได้ตามความมีขั้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอล, กลุ่ม 1, กลุ่ม 2, กลุ่ม 3, กลุ่ม 7 และกลุ่ม 8 แสดงฤทธิ์ที่ดีมาก มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ในช่วง 91.66-104.33 นาโนกรัมที่แสดงฤทธิ์ไปทดสอบหา IC_{50} พบว่ามีค่าดังนี้ 62.01 ± 2.20 , 180.94 ± 3.64 , 176.22 ± 0.69 , 70.15 ± 1.74 , 49.98 ± 2.06 และ 13.60 ± 0.32 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

นำสารกลุ่ม 7 และกลุ่ม 8 ไปทำการแยกได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ quercetagenin และ quercetagenin glycoside ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าให้ค่า IC_{50} 26.54 ± 1.74 และ 153.80 ± 0.83 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ลำดับ	สาร	$IC_{50} \pm S.D. (\mu\text{g/ml})$
	Gallic acid	21.21 ± 0.34
1	Crude TE(P)/EtOH	62.01 ± 2.20
2	TE(P)-ET/Gr. 1	180.94 ± 3.64
3	TE(P)-ET/ Gr. 2	176.22 ± 0.69
4	TE(P)-ET/ Gr. 3	70.15 ± 1.74
5	TE(P)-ET/ Gr. 4	Inactive
6	TE(P)-ET/ Gr. 5	inactive
7	TE(P)-ET/Gr. 6	inactive
8	TE(P)-ET/ Gr.7	49.98 ± 2.06
9	TE(P)-ET/ Gr.8	13.60 ± 0.32
10	Quercetagenin glucoside	153.80 ± 0.83
11	Quercetagenin	26.54 ± 1.74

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารประกอบที่สำคัญของดาวเรืองคือสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ผลการพิสูจน์โครงสร้างคือสาร quercetagenin glucoside และ quercetagenin และพบอีก 2 ชนิดเป็นสารกลุ่มไตรเทอร์ปีนและสเตียรอยด์ คือ β -amyrin และ β -sitosterol glucoside ตามลำดับ

กลุ่มสารที่แยกได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม พบว่ากลุ่ม 8 แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุด คือ มีค่า IC_{50} $13.60 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งดีกว่า 1.56 เท่าเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (gallic acid) และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ quercetagenin แสดงฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ซึ่งแสดงว่าในกลุ่ม 8 น่าจะมีสารที่แสดงฤทธิ์ดีกว่า quercetagenin หรือการแสดงผลฤทธิ์ขึ้นอยู่กับการอยู่ร่วมกันของสารกลุ่มนี้

quercetagenin glucoside แสดงฤทธิ์ต่ำกว่า 5.8 เท่าเมื่อเทียบกับ quercetagenin แสดงว่าหมู่ น้ำตาลมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือทำให้ฤทธิ์ลดลง

ข้อเสนอแนะ

ต้องแยกสารเพิ่มเติม และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

- Bagchi, K. and Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4, 350-360.
- Denny, A. and Buttriss J. (2013). *Synthesis No: Plant Foods and Health: Focus on Plant Bioactives*. [internet]. [cited 2012 March 11]. Available from: <http://www.Eurofir.net> CT-2005-513944.
- Hamburger, M., Adler, S., Baumann, D., Forg, A. and Weinreich, B. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of marigold at high pressures: comparison of analytical and pilot-scale extraction. *Fitoterapia*, 74, 328.
- Irene, P., Jaume, B., Francesc, V. and Carles, C. (2005) Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. *Phytochemistry*, 66, 2356-2362.
- Kanjana, W. (2011) *Chemistry and Biological Activities of Medicinal Plant: Estrogen-like Activity of diaryl heptanoids from Curcuma comosa Rhizomes and Anti-influenza Constituents from Thevetia Peruviana Flowers*. Ph.D.'s thesis, Ramkhamhaeng University.
- Maity, N., Nema, N. K., Abedy, M. K., Sarkar, B. K. and Mukherjee, P. K. (2011). Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 1300.
- Xu L.W., Chen J., Qi H.Y and Shi Y.P. (2012). Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, 4(2), 103-117.