สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพของสารสกัดจากดอกบัวสายที่ผ่านกระบวนการสกัดแบบต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Potential of water lily flower extracts in various extraction on total phenolic, flavonoid, anthocyanin, proanthocyanidin contents and antioxidant activities

นายสิริเชษฐ์ รัตนะชิตธวัช
ผู้วิจัย

ฝ่ายบริการ
- 8 ก.ค. 2558
- 7 ก.ค. 2558
354977

สิงหาคม 2557

รหัสโครงการ 2555A10862009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพของสารสกัดจากดอกบัวสายที่ผ่านกระบวนการสกัดแบบต่าง ๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Potential of water lily flower extracts in various extraction on total phenolic, flavonoid, anthocyanin, proanthocyanidin contents and antioxidant activities

นายสิริเชษฐ์ รัตนะชิตธวัช
ผู้วิจัย

คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการสำเร็จเป็นที่เรียบร้อยนั้น ต้องขอขอบคุณคณะผู้ร่วมวิจัยที่ร่วมมือร่วมใจ ตลอดจนผู้ช่วยวิจัยที่มีความขยันขันแข็ง จึงทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ และงานวิจัยนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

สิริเชษฐ์ รัตนะชิตธวัช
หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ ศักยภาพของสารสกัดจากดอกบัวสายที่ผ่านกระบวนการสกัดแบบต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งเงินทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)
ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 260,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555

หัวหน้าโครงการ นายสิริเชษฐ์ รัตนะชิดธวัช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และโปรแอนโทไซยานิดิน ปริมาณแอนโทไซนานิน รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากส่วนของดอกบัวสายสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอล และจากการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าในสารสกัดดอกบัวสายสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 60 มีศักยภาพในการสกัดทั้งในด้านปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และเมื่อนำมาสกัดดอกบัวสีเหลืองและสีม่วงน้ำเงิน พบว่าดอกบัวสีแดงให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 17.22±1.14 mg gallic acid/g sample ส่วนดอกบัวสีเหลืองให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ที่วัดด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 24.01±2.02 mg Vit C/g sample และ 60.17±6.37 mg Trolox/g sample ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นของเอทานอลไม่มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในสารสกัดกลีบดอกบัวสายสีแดง และผลจากการหมักดอกบัวสายสีแดงด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy พบว่าการหมักมีแนวโน้มคงที่ทั้งในด้านปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติในระหว่างการหมักตั้งแต่วันเริ่มต้นการหมักและวันสุดท้ายของการหมัก แต่อย่างไรก็ตามดอกบัวสายยังคงเป็นพืชที่มีความน่าสนใจโดยเฉพาะอย่างยิ่งศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระหากมีการนำไปประยุกต์ใช้ให้ถูกวิธีจะเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชพื้นบ้านในอีกทางหนึ่ง

Research Title: Potential of water lily flower extracts in various extraction on total phenolic, flavonoid, anthocyanin, proanthocyanidin contents and antioxidant activities

Researcher: Mr. Sirichet Rattanachitthawat

Faculty: Agricultural Technology, Burapha University, Sa Kaeo Campus

Abstract

This research emphasized the contents of phenolic, flavonoid, anthocyanin, proanthocyanidin and antioxidant activities of water lily flower extracts. The water lily flower extraction was performed in the ethanolic methods and yeast fermentation method. The 60% ethanolic is the better than other in total phenolic contents and antioxidant properties. This condition was used in extraction in various colors of lily flower, red, yellow, and blue. The result shown that red lily flower has the highest total phenolic content, 17.22±1.14 mg gallic acid/g sample. However, the yellow lily flower has the highest antioxidant activities that were evaluated by DPPH and ABTS method, 24.01±2.02 mg VitC/g sample and 60.17±6.37 mg Trolox/g sample, respectively. The various concentration of ethanol does not have impact to flavonoid, anthocyanin, proanthocyanidin contents. For the fermentation method, the water lily was fermented by *Saccharomyces cerevisiae* in various total soluble solid contents. The result shown that the yeast growth normally but the profile of total phenolic content and antioxidant activity does not change during fermentation.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ I
บทคัดย่อภาษาไทย II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VI
สารบัญภาพ VII
บทนำ..... 1
วัตถุประสงค์การวิจัย 7
วิธีดำเนินการวิจัย 7
ผลการวิจัย 13
1. ศึกษาระดับของเอทานอลที่มีความเหมาะสมต่อการสกัดดอกบัวสาย 13
2. ศึกษาการสกัดดอกบัวด้วยระดับเอทานอลที่มีความเหมาะสม 15
3. ศึกษาการสกัดดอกบัวสายด้วยการใช้ความร้อนร่วมกับการหมักทางชีวภาพ
โดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ Saccharomyces cerevisiae 15
4. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 23
อภิปรายผล 25
สรุปผลการวิจัย 26
ผลผลิต 26
บรรณานุกรม 27
รายงานสรุปการเงิน 29
ประวัตินักวิจัย 30

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ปริมาณสารโพลีฟีนอล ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทซียานิดินทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของการสกัดดอกบัวสายด้วยเอทานอลที่ระดับต่างๆ 14

2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของการสกัดดอกบัวสายด้วยเอทานอลที่ระดับต่างๆ 14

3 ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกบัว 3 สี 15

4 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15, 18 และ 20 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน.....19

5 ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินในน้ำหมักกลีบและเกสรของดอกบัวสายที่มีปริมาณ ของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15, 18 และ 20 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลา 14 วัน 21

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ดอกบัวสาย 2
2 ใบบัวสาย 2
3 กลีบดอกบัวสาย 3
4 กลีบเลี้ยงบัวสาย.....10
5 ก้านดอกบัวสายหรือสายบัว 11
6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน โดยจำนวนเซลล์ยีสต์ (-◆-) ปริมาณเอทานอล (-■-) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (-△-).....10
7 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน โดยจำนวนเซลล์ยีสต์ (-◆-) ปริมาณเอทานอล (-■-) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (-△-).....17
8 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน โดยจำนวนเซลล์ยีสต์ (-◆-) ปริมาณเอทานอล (-■-) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (-△-).....17
9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักของดอกบัวสายที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน.....18
10 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสาย ที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน.....20
11 ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลา 14 วัน.....21

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

12 การดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.0 และ 4.5.....22
13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน.....23
14 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน.....24

บทนำ

บัวจัดเป็นพรรณไม้น้ำที่รู้จักกันมาเป็นเวลานาน มีดอกสวยงามทั้งสีสันและรูปร่าง ในประเทศไทยบัวที่นิยมปลูกมีเพียง 3 สกุล ได้แก่ สกุลบัวหลวง (Genus Nelumbo Adans) สกุลบัวสาย (Genus Nymphaea Lin.) และสกุลบัววิกตอเรีย (Genus Victoria Lindl) (สุปราณี วนิชชานนท์, 2540) สำหรับสกุลบัวสาย จัดอยู่ในกลุ่มบัวอุบลชาติล้มลุก (Tropical waterlily) สกุล Nymphaea เป็นบัวที่มีลำต้นใต้ดินเป็นหัวหรือเหง้า ใบและดอกเกิดจากตาหรือหน่อที่เจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำด้วยก้านส่งใบและยอด บางชนิด มีใบใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยว มีขอบใบทั้งแบบเรียบและแบบคลื่น ผิวใบด้านบนเรียบเป็นมัน ด้านล่างมีขนละเอียด หรืออาจจะไม่มีขน ดอกเป็นดอกเดี่ยว มีทั้งชนิดที่บานกลางคืนและบานกลางวัน บางชนิดมีกลิ่นหอม มีสีสันหลากหลายแตกต่างกัน จัดได้ว่าเป็นกลุ่มที่พบได้มากในประเทศไทย เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีในสภาพภูมิประเทศที่มีอากาศร้อน (กมลวรรณ เตชะวณิช, 2554) ซึ่งจะสามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่สายบัวจะถูกนำมาบริโภคเป็นผัก โดยจะบริโภคเป็นผักสดหรือนำมาเป็นส่วนผสมในอาหาร ประเภท ต้ม ผัด แกง เป็นต้น ส่วนของดอกจะนำมาเป็นไม้ประดับเพื่อความสวยงาม หรือทิ้งไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งกลีบดอกของบัวสายมีรงควัตถุหรือเม็ดสีอยู่ภายใน โดยได้มีการรายงานว่าดอกบัวมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญอยู่ จากผลการวิจัยเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญในดอกบัวสายสีต่างๆ ของ Manlan และคณะ (2012) พบว่า ดอกบัวสายที่มีกลีบสีแดง กลีบสีน้ำเงิน กลีบสีขาว และกลีบสีเหลือง มีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavoniod) เช่น Flavonols และสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) อยู่ในดอกบัวสายที่มีกลีบสีแดงและกลีบสีน้ำเงินอีกด้วย ซึ่งถือเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะมีบทบาทต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ (เจนจิรา จิรัมย์, 2554)

บัวสายมีชื่อเรียกกันว่า Water lily และมีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า อุบลชาติ หรือ บัวสาย แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ อุบลชาติยืนต้น เช่น บัวฝรั่ง และอุบลชาติล้มลุก เช่น บัวสาย บัวผัน บัวเผื่อน จงกลนี บัวยักษ์ออสเตรเลีย บัวนางกวัก เป็นต้น (ไชยา อุ้ยสูงเนิน และลาวัลย์ ฉัตรวิรุฬห์, 2548) ในประเทศไทยบัวที่พบส่วนมากเป็นอุบลชาติล้มลุก ซึ่งมีลักษณะที่ใช้ประกอบการจำแนกพันธุ์ ดังนี้

1) ดอก ดอกตูมมี 3 ลักษณะ คือ ทรงดอกป้อม ทรงดอกค่อนข้างป้อม และทรงดอกยาว และดอกบานมี 3 ลักษณะเช่นกัน คือ ดอกบานป้อมรูปถ้วย ดอกบานแผ่ครึ่งวงกลม ดอกบานแผ่ค่อนวงกลม เมื่อดอกบานจะชูขึ้นเหนือน้ำหรือไม่ก็ลอยบนผิวน้ำ ดังแสดงในภาพที่ 1 มีทั้งที่มีกลิ่นอ่อน ถึงหอมมาก และไม่มีกลิ่นเลย ซึ่งดอกบัวสายจะประกอบด้วยกลีบเลี้ยง กลีบดอก ก้านชูอับเกสร อับละอองตัวผู้ เกสรตัวเมีย และรังไข่ สีของกลีบดอกบัวสายมี 3 สี คือ สีขาว สีชมพู และสีแดง (สุปราณี วนิชชานนท์, 2540)

ภาพที่ 1 ดอกบัวสาย

ที่มา: http://board.trekkingthai.com/board/show.php?forum_id=18&topic_no=140442&topic_id=142197

2) ใบ ลักษณะของใบที่พบโดยทั่วไปมี 2 ลักษณะ คือ เป็นรูปวงกลมและรูปไข่ ความกว้างของใบเมื่อแก่เต็มที่จะขึ้นอยู่กับสภาพการปลูกและสิ่งแวดล้อม ขอบใบมี 4 ลักษณะ คือ ขอบใบเรียบ ขอบใบย่น ขอบใบจักมนไม่เป็นระเบียบ และขอบใบจักแหลมเป็นระเบียบ และ หูใบมี 3 ลักษณะ คือ ปลายมน ปลายเว้า และปลายแหลม ส่วนสีของใบจะแตกต่างกันไปทั้งใบอ่อนและใบแก่ ใบมีทั้งลักษณะที่มีขนและไม่มีขน ฐานใบจะมีดั้งแต่เปิดกว้าง เปิดเพียงครึ่งหนึ่ง หรือปิดซ้อนทับกัน บางชนิดจะมีใบอยู่ใต้น้ำ ดังแสดงในภาพที่ 2 (สุปราณี วนิชชานนท์, 2540)

ภาพที่ 2 ใบบัวสาย

ที่มา : http://2553waw.wordpress.com/งานอดิเรก/ลักษณะทางพฤกษศาสตร์/244-2/

3) กลีบดอก มีลักษณะทั้งกลีบเรียวยาว ปลายกลีบเรียว แหลมหรือมน โคนกลีบครึ่งล่างกว้าง ครึ่งปลายเรียวแหลมหรือมน ความซ้อนของกลีบดอกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ซ้อนน้อย ซ้อน และซ้อนมาก ดังแสดงในภาพที่ 3 (สุปราณี วนิชชานนท์, 2540)

ภาพที่ 3 กลีบดอกบัวสาย

ที่มา : http://ayattin.files.wordpress.com/2011/08/e0b898e0b8b1e0b88de0b881e0b8b2e0b8a4.jpg

4) กลีบเลี้ยง กลีบเลี้ยงด้านนอกบางสายพันธุ์นอกจากจะมีสีเขียวแล้วยังมีลายเส้นหรือจุดประบนกลีบเลี้ยงอีกด้วย ส่วนด้านบนของกลีบเลี้ยงจะมีสีเดียวกันกับกลีบดอก มีประมาณ 4-6 กลีบ ดังแสดงในภาพที่ 4 (สุปราณี วนิชชานนท์, 2540)

ภาพที่ 4 กลีบเลี้ยงบัวสาย

ที่มา : http://diarylove.com/forum_posts.asp?TID=11700

5) ก้าน ก้านดอกและก้านใบมีลักษณะอวบน้ำ ผิวจะเรียบและมีขนปกคลุมเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 5 (สุปราณี วนิชชานนท์, 2540)

ภาพที่ 5 ก้านดอกบัวสายหรือสายบัว

ที่มา : http://www.monmai.com/บัวสาย/

อนุมูลอิสระ (Free radicals) คือกลุ่มโมเลกุลที่ไม่เสถียรเนื่องจากมีอิเลคตรอนในโมเลกุลขาดหรือเกิน ความไม่เสถียรของอนุมูลอิสระดังกล่าวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่กับกลุ่มชีวโมเลกุลปกติในร่างกาย ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจนเกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุลในระดับเซลล์ เช่น ดีเอนเอ (DNA) โปรตีนและลิพิด ภาวะที่ไม่สมดุลของอนุมูอิสระดังกล่าวจะเรียกว่าเป็นภาวะเครียดออกซิเดชั่น (Oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะที่มีอนุมูลอิสระสูงเกินความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายจะกำจัดได้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหลอด เลือดหัวใจ (Cardiovascular disease), เบาหวาน (Diabetes mellitus), ความจำเสื่อม (Alzheimer), โรคมะเร็ง (Cancer) การเกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกายมาจาก 2 ปัจจัยคือ จากปัจจัยภายในซึ่งเกิดจากการสร้างอนุมูลอิสระที่สูงผิดปกติจากขบวนการของร่างกาย เช่น ขบวนการหายใจ การป้องกันการอักเสบ และการต่อต้านเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย อีกปัจจัยหนึ่งเป็นปัจจัยภายนอกร่างกาย เช่น สารเคมี ยา รังสี และแสงแดด โดยปกติร่างกายมีกลไกควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะสมดุลโดยอาศัยกลุ่มเอนไซม์ ต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเอง เช่น กลูต้าไธโอน (Glutathione) ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) คาตาเลส (Catalase) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่าในพืชมีสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ ได้แก่ วิตามินซี เอและอี และยังพบอีกว่าในพืชมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน และโดยเฉพาะพืชที่มีสีจะเป็นแหล่งสำคัญของสารกลุ่มโพลีฟีนอล (Huabbangyang และคณะ, 2010)

สารโพลีฟีนอล (polyphenols) (Rice และคณะ, 1997) เป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบไปด้วย ฟีนอลมาเชื่อมต่อกัน สามารถพบได้ในการสังเคราะห์ของพืช ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้พืชมีสีและยังช่วยในการป้องกันตัวเองของพืช โดยสารกลุ่มโพลีฟีนอลสามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มฟีนอลลิคแอซิด (phenolic acid) ได้แก่ caffeic acid vanillin และ hydroxyl cinnamic acid เป็นต้น และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งจะสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ดังต่อไปนี้

1. Anthocyanins เป็นกลุ่มรงควัตถุที่ละลายน้ำและให้สีเข้ม พบในผลไม้ ผักและดอกไม้ที่มีสีชมพูไปจนสีแดงสด ม่วงจนถึงน้ำเงิน พบมากในองุ่นและผลไม้ตระกูลเบอรี่ต่างๆ โดยมีการค้นพบสารในกลุ่มนี้กว่า 500 ชนิด ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ cyaniding, pelargonidin, delphinidin, maloidin และ paeonidin

2. Catechins หรือ flavonols พบมากในชา องุ่น โกโก้ ตัวอย่างสารประเภทนี้ได้แก่ monomeric flavan-3-ols catechin, epicatechin, gallocatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-o-gallate, fisetin, isoquercetin และ hyperoside

3. Flavones ตัวอย่างสารในกลุ่ม ได้แก่ apigenin, luteolin

4. Flavanones ตัวอย่างสารในกลุ่ม ได้แก่ hesperidin, naringin

5. Isoflavones ตัวอย่างสารในกลุ่ม ได้แก่ genistein daidzein พบในถั่วเหลือง

6. Lignins พบในพืชเปลือกแข็งและธัญพืช

7. Proanthocyanidins พบในองุ่น ไวน์แดง เมล็ดองุ่น

8. Proyanidins (oligomeric catechins) พบในไวน์แดง องุ่น เมล็ดองุ่น

9. Stilbenes ได้แก่ resveratrol

10. Tannins พบในไวน์แดง ชา เป็นกลุ่มสารที่ทำให้มีรสฝาดเฝื่อน

กลไกลการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet}$$

$$R^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow RA$$

$$RO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROA$$

2. ยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, O_2)

ตัวอย่างสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน โดยการเปลี่ยน ($^1O_2^{\bullet}$) ให้อยู่ในรูปทริปเปร็ท (triplet oxygen ($^3O_2$)) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อนโดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) จำนวน 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกล็ทออกซิเจน ได้ถึง 1,000 โมเลกุล (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

$$^1O_2^{\bullet} + {}^1Car \longrightarrow 3O_2 + {}^3Car^{\bullet}$$

$$^3Car^{\bullet} \longrightarrow {}^1Car + \text{thermal energy}$$

3. หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

วิตามินอี (α-tocopherol ; Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^{\bullet}$) (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

4. เสริมฤทธิ์ (synergism)

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α-tocopherol) กับวิตามินซี (ascorbic acid) โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานได้ในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) เหมือนกับวิตามินอี แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟ่า-โทโคฟีรอลเปอร์ออกซิล (α-tocopherol peroxyl) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลฟ่า-โทโคฟีรอล กับอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^{\cdot}$) เพื่อที่จะเปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟ่า-โทโคฟีรอล ที่สามารถทำงานได้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

5. ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition)

สารประกอบฟีนอลิกที่มีความสำคัญบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแกลเลต สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิโพออกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอ็นไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สมนึก ยิ้มย่อง (2552) พบว่าดอกบัวในกลุ่มอุบลชาติ 4 สายพันธุ์คือ ฉลองขวัญ เรดแฟลร์ สุทธาสิโนบลสีชมพูและสุทธาสิโนบลสีน้ำเงินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันเมื่อตรวจสอบโดยวิธี FRAP อย่างไรก็ตามการตรวจสอบโดยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกลีบบัวเรดแฟลร์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด 1128.8 mM TEAC/gFW และจากบัวฉลองขวัญน้อยที่สุดคือ 524.9 mM TEAC/gFW

สมนึก ยิ้มย่อง (2553) พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกบัวพันธุ์เรดแฟลร์มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอล แอนโทไซยานิน และกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มากที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากกลีบดอกบัวพันธุ์สุทธาสิโนบลาสีชมพูให้ผลดีกับวิธี FRAP นอกจากนี้ยังพบสารสกัดจากดอกบัวพันธุ์ฉลองขวัญ เรดแฟลร์ สุทธาสิโนบลสีชมพูและสุทธาสิโนบลสีน้ำเงินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Actietobacter, Staphylococus, Streptococus และ *Bacillus cereus*

ดังนั้นบัวสายที่มีดอกสีต่างๆ จึงมีความน่าสนใจใน การนำมาศึกษาถึงปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินและฤทธิ์โนการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นโอกาสที่จะสร้างผลงานวิจัยเพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ รวมถึงเป็นการสร้างแนวทางการใช้ประโยชน์และสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลิตผลทางเกษตร เพื่อผลักดันให้เป็นพืชเศรษฐกิจในลำดับต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณของสารฟีนอลลิคทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินในสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของดอกบัวสายที่ได้จากกระบวนการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และกระบวนการร่วมของการใช้ความร้อนและการหมักทางชีวภาพ

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของดอกบัวสายที่ได้จากกระบวนการสกัดโดยใช้ตัวทาละลายอินทรีย์และกระบวนการร่วมของการใช้ ความร้อนและการหมักทางชีวภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สำรวจแหล่งวัตถุดิบและรวบรวมวัตถุดิบ ดอกบัวสาย 3 สี คือ แดง เหลือง และม่วงน้ำเงิน

2. สกัดดอกบัวสายด้วยกระบวนการ 2 กระบวนการ คือ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และการใช้ความร้อนร่วมกับกระบวนการหมักทางชีวภาพ

2.1การเตรียมตัวอย่างดอกบัว

นำดอกบัวสายมาทำการแยกส่วนกลีบและเกสรออกจากกัน จากนั้นล้างน้ำให้สะอาด และผึ่งให้แห้ง นำส่วนของกลีบดอกไปหั่นฝอยให้มีขนาดเท่าๆ กัน ประมาณ 1 มิลลิเมตร และนำส่วนของเกสรและกลีบที่เตรียมได้ไปชั่งใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร อย่างละ 5 กรัม เพื่อนำไปสกัดด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และการใช้ความร้อนร่วมกับกระบวนการหมักทางชีวภาพ โดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

2.2 ศึกษาระดับของเอทานอลที่มีความเหมาะสมต่อการสกัดดอกบัวสาย

นำส่วนของเกสรและกลีบที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาเติมตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 40 60 80 และ 99 ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ทำการเขย่าไว้ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างสารสกัดที่ได้ใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนออกจากตัวอย่างเก็บส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงได้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์

2.3 ศึกษาการสกัดดอกบัวด้วยระดับเอทานอลที่มีความเหมาะสม

นำดอกบัวทั้ง 3 สี คือ สีแดง สีเหลือง สีน้ำเงิน มาทำการสกัดด้วยระดับเอทานอลที่เมหาะสมจากข้อ 2.2 โดยนำส่วนของเกสรและกลีบที่ผ่านการลดขนาดไปชั่งใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร อย่างละ 5 กรัม เติมตัวทำละลายเอทานอลที่มีความเหมาะสมตามการศึกษาในข้อ 2.2 ทำการเขย่าไว้ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างสารสกัดที่ได้ใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนออกจากตัวอย่างเก็บส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงได้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์

2.4 ศึกษาการสกัดดอกบัวสายโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการหมักทางชีวภาพ

ด้วยการศึกษาการสกัดดอกบัวสายโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการหมักทางชีวภาพจะทำการศึกษาในดอกบัวสายสีแดงเพียงอย่างเดียวเนื่องจากการศึกษาต้องใช้ดอกบัวในประมาณมากทำให้ดอกบัวอีก 2 สี นั้นมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการทำปฏิบัติการภายช่วงเวลาเดียวกัน

การเตรียมวัตถุดิบและน้ำหมักเพื่อใช้ในการหมักดอกบัวสาย

นำดอกบัวสายที่ผ่านการเตรียมและลดขนาดจากข้อ 2.1 จำนวน 10 กรัม ใส่ขวดแก้วแบบปิดฝาได้ จากนั้นใส่น้ำหมักที่เตรียมได้จากการนำน้ำกรองมาต้ม จากนั้นปรับปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ด้วยน้ำตาลทรายเป็น 15 18 และ 20 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่อน้ำหมัก 1 ลิตร และปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 3.5 ด้วยกรดซิตริก นำน้ำต้มที่เตรียมได้บรรจุลงในขวดที่เตรียมไว้ขวดละ 100 มิลลิลิตร จากทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นเพื่อหมักดอกบัวสาย

นำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ซึ่งเลี้ยงอยู่บนอาหารวุ้นเอียง ใส่ลงในฟลาสก์ซึ่งบรรจุอาหาร Malt Yeast Extract (YM broth) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

การหมักบัวสาย

ทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในน้ำหมักที่เตรียมไว้ โดยให้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในน้ำหมักเท่ากับ 1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน โดยในระหว่างการหมักทำการวัดการเจริญเติบโตของยีสต์ วัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ โดยใช้เครื่องวัดการหักเหของแสงแบบส่องผ่าน (Hand Refractometer) และวัดปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนออกจากตัวอย่างเก็บส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารออกฤทธิ์ ภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์

3. วัดปริมาณสารโพลีฟีนอล ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทซียานิดินทั้งหมด

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Singleton และคณะ, 1999)

นำสารสกัดได้ในข้อ 2.2 2.3 และ 2.4 มา 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 790 ไมโครลิตร เติมสารละลายโฟลินซิโอแคลตู 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้กัน หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแสดงอยู่ในรูปไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิค (gallic acid equivalent: GAE) ต่อกรัมตัวอย่างโดยคำนวณตามสมการดังนี้ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมตัวอย่าง)

$$= [(A_{725}-B)/M] \times D$$

โดยที่ : A_{725} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานแกลลิค

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่างผลิตภัณฑ์

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (ดัดแปลงจาก Mengcheng และคณะ, 1998)

นำสารสกัดได้ในข้อ 2.2 และ 2.4 มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร สารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายคาเทชินเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแสดงอยู่ในรูปไมโครกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมตัวอย่าง โดยคำนวณตามสมการดังนี้

$$A = 0.01069\ C - 0.001163$$

โดยที่ : A คือ ค่าการดูดกลืนแสง

C คือ ปริมาณฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัมต่อกรัม)

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทรไซยานิน (ดัดแปลงจาก Monica และ Ronald, 2001)

นำสารสกัดได้ในข้อ 2.2 และ 2.4 มาเติมโพแทสเซียมคลอไรด์ พีเอช 1.0 หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำสารสกัดได้ในข้อ 2.2 และ 2.4 มาเติมโซเดียมอะซิเตท พีเอช 4.5 หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{Monomeric anthocyanin (mg/liter)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\varepsilon \times 1)$$

โดยที่ : $A = (A_{\lambda vis\max} - A700)_{pH1.0} - (A_{\lambda vis\max} - A700)_{pH4.5}$

MW = มวลโมเลกุล

DF = Dilution factor (ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนมีปริมาตร เป็น 3 มิลลิลิตร ใช้ค่า DF เท่ากับ 15)

ε = โดยคิดเป็นปริมาณของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3 glucoside) ซึ่งเท่ากับ 26,900 $M^{-1}cm$

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดิน (ดัดแปลงมาจาก Sun และคณะ, 1998)

นำสารสกัดได้ในข้อ 2.2 และ 2.4 มา 66 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 417 ไมโครลิตร ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 9 โมลต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายคาเทชินเป็นสารมาตรฐาน

ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินทั้งหมดแสดงอยู่ในรูปไมโครกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมตัวอย่าง โดยคำนวณตามสมการดังนี้

$$A = [(A_{[s]} - A_{[b]}) - (A_{[c]} - A_{[0]})$$

โดยที่ : $A_{[s]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร เมตร ของ 0 มิลลิกรัมคาเทชิน

$A_{[b]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร ของ 0 มิลลิกรัมคาเทชิน

$A_{[c]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

$A_{[0]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร ของชุดควบคุม

4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.1 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก Gamez และคณะ, 1998)

สารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrythydrazydraztl) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปิเปตมาปริมาตร 950 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2 2.3 และ 2.4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณหาร้อยละการยับยั้งและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้กรดแอสคอบิคเป็นสารมาตรฐาน โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะแสดงอยู่ในรูปกรัมสมมูลของกรดแอสคอบิคต่อกรัมตัวอย่าง โดยคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A_{[0]}-A_{[t]})/A_{[0]}] \times 100$$

โดยที่: $A_{[0]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นเริ่มต้น

$A_{[t]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอบิคต่อกรัมตัวอย่าง)

$$= [(A_{517}-B)/M] \times D$$

โดยที่: A_{517} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิค

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิค

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่างผลิตภัณฑ์

4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ดัดแปลงจาก RE และคณะ, 1995)

ทดสอบโดยเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เท่ากับ 0.90-1.0 จากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เจือจาง ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2 2.3 และ 2.4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะแสดงอยู่ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง โดยคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A_{[0]}-A_{[t]})/A_{[0]}] \times 100$$

โดยที่: $A_{[0]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นเริ่มต้น

$A_{[t]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง)

$$= [(A_{725}-B)/M] \times D$$

โดยที่: A_{725} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่างผลิตภัณฑ์

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยนำข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอกลิกทั้งหมด คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS รวมถึงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทรไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

จากการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากดอกบัวสายซึ่งได้มาจากแหล่งธรรมชาติ โดยเฉพาะดอกบัวสายสีแดงที่สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำตามชุมชนทั่วไป แต่ดอกบัวสีม่วงน้ำเงินและเหลืองนั้น ค่อนข้างที่จะหาพบได้ยาก นำมาผ่านกระบวนการสกัดแบบต่างๆ ทั้งการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และนำมาวิเคราะห์ถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. ศึกษาระดับของเอทานอลที่มีความเหมาะสมต่อการสกัดดอกบัวสาย

จากการศึกษาระดับของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดดอกบัวสาย ได้ทำการทดลองกับกลีบดอกและเกสรบัวสายสีแดงอย่างละ 5 กรัม สกัดในตัวทำละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20 40 60 80 และ 99 และนำสารสกัดไปวัดวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอล ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทซียานิดินทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ผลจากการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดจากดอกบัวสายสีแดงด้วยเอทานอล โดยคิดเทียบเป็นสมมูลของสารมาตรฐานกรดแกลลิค พบว่าตัวอย่างสารสกัดจากดอกบัวสายสีแดงที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด 3 อันดับแรกคือ ตัวอย่างสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีชมพูที่ได้จากการสกัดด้วยความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 80 60 และ 99 ตามลำดับ เมื่อคิดเทียบเป็นสมมูลของกรดแกลลิค มีค่าเท่ากับ 18.25 17.22 และ 13.25 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิคต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 และ 60 จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทซียานิดินของทุกระดับของเอทานอลที่ใช้สกัดไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 1 ปริมาณสารโพลีฟีนอล ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทซียานิดินทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของการสกัดดอกบัวสายด้วยเอทานอลที่ระดับต่างๆ

เอทานอล (%)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg Gallic acid/g sample)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (µg catechin/ g sample)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg Cyanidin-3 glucoside/g sample	โปรแอนโทไซยานิดิน (µg catechin/ g sample)
20%	6.71 ± 0.91^{c}	8.50 ± 1.10^{b}	1.22 ± 0.62^{a}	7.70 ± 1.67^{b}
40%	12.50 ± 1.13^{b}	11.00 ± 1.13^{a}	1.00 ± 0.63^{a}	14.52 ± 2.94^{a}
60%	17.22 ± 1.14^{a}	11.57 ± 1.13^{a}	1.83 ± 0.35^{a}	13.63 ± 1.97^{a}
80%	18.25 ± 1.44^{a}	11.57 ± 0.01^{a}	1.64 ± 0.32^{a}	10.66 ± 2.16^{a}
99%	13.25 ± 1.10^{b}	10.50 ± 0.01^{a}	1.79 ± 0.37^{a}	13.53 ± 1.66^{a}

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของการสกัดดอกบัวสายด้วยเอทานอลที่ระดับต่างๆ

เอทานอล (%)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
	DPPH (mg VitC/g sample)	ABTS (mg Trolox/g sample)
20%	7.48 ± 0.30^{c}	21.02 ± 1.04^{c}
40%	10.40 ± 0.10^{b}	38.78 ± 1.90^{a}
60%	15.82 ± 0.12^{a}	40.23 ± 2.33^{a}
80%	16.30 ± 0.21^{a}	41.28 ± 5.29^{a}
99%	10.87 ± 0.25^{b}	29.75 ± 2.29^{b}

2. ศึกษาการสกัดดอกบัวด้วยระดับเอทานอลที่มีความเหมาะสม

จากการศึกษาการสกัดดอกบัว 3 สี คือ แดง เหลือง และม่วงน้ำเงิน ด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 และนำสารสกัดไปวัดวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางที่ 3 พบว่าดอกบัวสายสีแดงมีปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุดคือ 17.60±1.14 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมตัวอย่าง แต่ดอกบัวสีเหลืองให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยการวัดประเมินด้วยวิธี DPPH และ ABTS โดยมีค่าเท่ากับ 24.01±2.02 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอบิคต่อกรัมตัวอย่าง และ 60.17±6.37 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

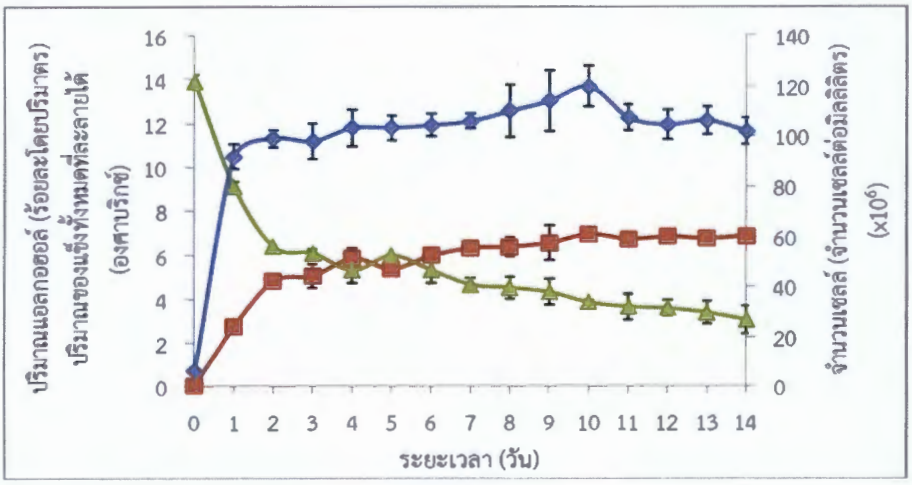
ตารางที่ 3 ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกบัว 3 สี

ดอกบัว	ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด (mg Gallic acid/g sample)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
		DPPH (mg VitC/g sample)	ABTS (mg Trolox/g sample)
สีแดง	17.60±1.14	18.36±0.71	23.01±3.35
สีม่วงน้ำเงิน	9.06±0.95	13.75±0.24	23.22±2.41
สีเหลือง	12.38±0.53	24.01±2.02	60.17±6.37

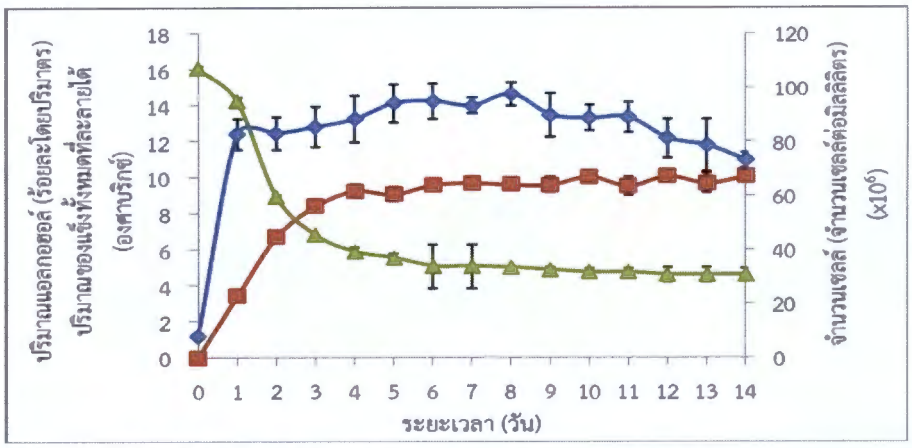
3. ศึกษาการสกัดดอกบัวสายด้วยการใช้ความร้อนร่วมกับการหมักทางชีวภาพ โดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

การเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ในตัวอย่างน้ำหมักของดอกบัวสาย หลังจากการหมักเป็นเวลา 14 วัน พบว่าน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 6.00×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 10.20×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยในวันที่ 10 ของการหมักพบว่ายีสต์มีการเจริญสูงที่สุด คือ 11.97×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของกระบวนการหมัก จากนั้นการเจริญของยีสต์จะเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ตั้งแต่วันที่ 5-9 และในวันที่ 10-14 ยีสต์มีการเจริญเติบโตลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ยีสต์สร้างขึ้นพบว่าแปรผันกับปริมาณ

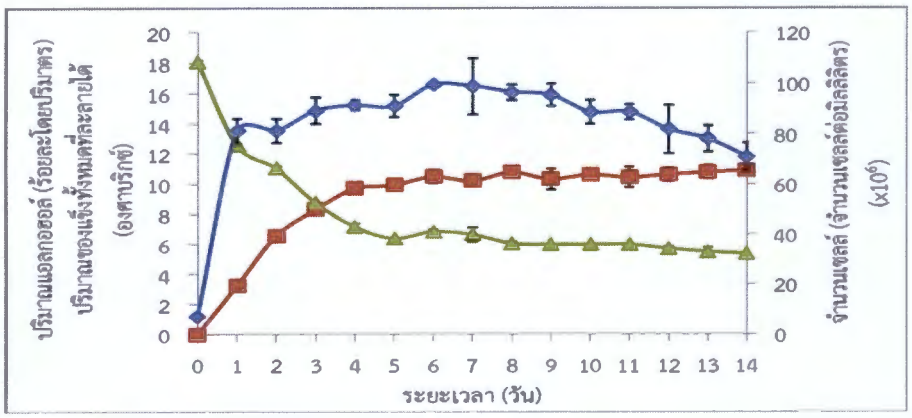
ของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ โดยยีสต์มีการใช้น้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 77.91 จากปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น เท่ากับ 13.9±0.30 องศาบริกซ์ ลดลงเหลือ 3.07±0.61 องศาบริกซ์ ดังแสดงในภาพที่ 6 สำหรับน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์ ยีสต์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น $7.77x10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น $7.32x10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งในวันที่ 8 ของการหมัก พบว่าการเจริญของยีสต์สูงที่สุด คือ 9.75 $x10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ยีสต์สร้างขึ้น พบว่าแปรผันกับปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ โดยยีสต์มีการใช้น้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 71.36 จากปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น เท่ากับ 16.07±0.12 องศาบริกซ์ ลดลงเหลือ 4.60±0.35 องศาบริกซ์ ดังแสดงในภาพที่ 7 ส่วนน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์ ยีสต์มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุดจากทั้งสามตัวอย่าง ซึ่งมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น $7.25x10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น $7.10x10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และพบว่ายีสต์มีการเจริญสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับ $9.93x10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ยีสต์สร้างขึ้นพบว่าแปรผันกับปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ โดยยีสต์มีการใช้น้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 70.12 จากปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น เท่ากับ 18.07±0.12 องศาบริกซ์ ลดลงเหลือ 5.40±0.00 องศาบริกซ์ ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน โดยจำนวน
เซลล์ยีสต์ (—◆—) ปริมาณเอทานอล (—■—) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (—▲—)



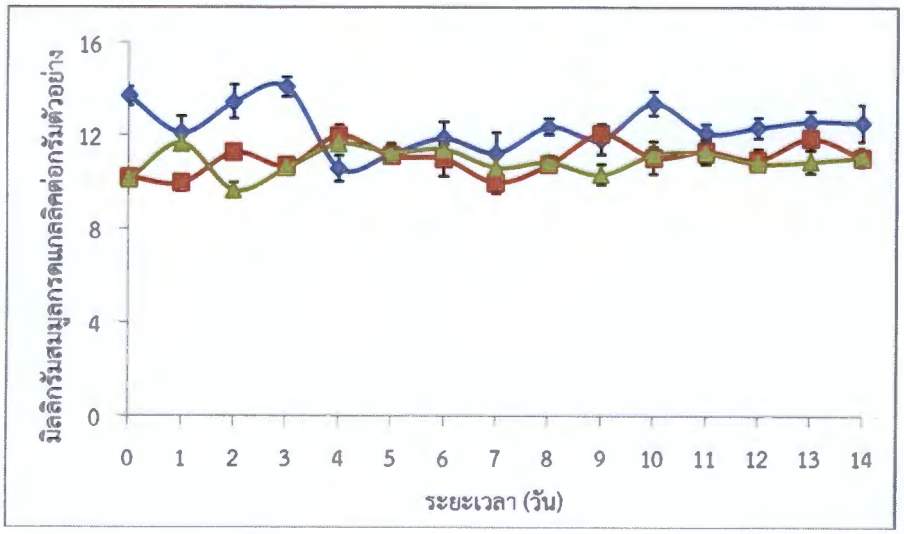
ภาพที่ 7 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน
โดยจำนวนเซลล์ยีสต์ (◆ ปริมาณเอทานอล (■) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้(▲)



ภาพที่ 8 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน โดย
จำนวนเซลล์ยีสต์ (◆) ปริมาณเอทานอล (■) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (▲)

การศึกษาปริมาณสารโพลีฟีนอล ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน และปริมาณโปรแอนโทซียานิดินทั้งหมด จากการหมักดอกบัวสายด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างน้ำหมักของดอกบัวที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน โดยคิดเทียบเป็นสมมูลของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค (Gallic Acid Equivalent : GAE) ดังแสดงในภาพที่ 9 พบว่า น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 12.56±0.81 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมตัวอย่าง ในวันที่ 14 ของกระบวนการหมัก รองลงมาคือน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 และ 18 องศาบริกซ์ ซึ่งค่าเท่ากับ 11.10±0.21 และ 11.08±0.38 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมตัวอย่าง ในวันที่ 14 ของกระบวนการหมัก ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาจากแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างไม่แตกต่างกันในระหว่างการหมักทั้ง 14 วัน



ภาพที่ 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักของดอกบัวสายที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน

(◆) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์

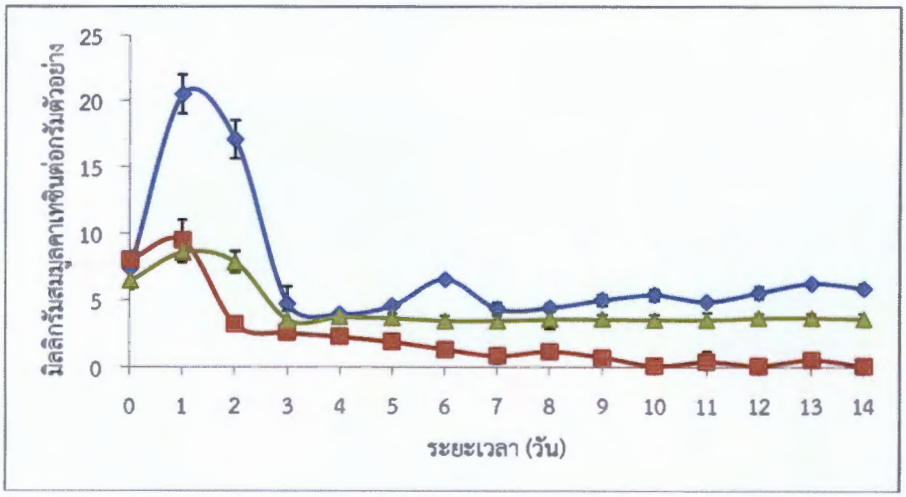
(■) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์

(▲) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

ในการตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยด์ของตัวอย่างน้ำหมักของดอกบัวสายที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วันโดยค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลของสารละลายมาตรฐานคาเทชิน เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักทั้งสามชุด พบว่าตัวอย่างน้ำหมักทั้งสามชุดมีปริมาณฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยในช่วงวันที่ 1-2 ของกระบวนการหมัก น้ำหมักทั้งสามชุดมีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ก่อนที่จะลดลงในวันที่ 3 จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก และตั้งแต่วันที่ 3-14 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างเดียวกันมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ในตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้นต่างกัน ส่งผลให้มีปริมาณฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน ดังนั้นปริมาณฟลาโวนอยด์ในการทดลองจึงมีค่าแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 10

ตารางที่ 4 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในน้ำหมักดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15, 18 และ 20 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมตัวอย่าง)		
	15°Brix	18°Brix	20°Brix
0	7.34 ± 0.87^{b}	8.06 ± 0.62^{b}	6.43 ± 0.63^{a}
1	20.55 ± 1.47^{b}	9.48 ± 1.55^{a}	8.60 ± 0.79^{a}
2	17.07 ± 1.44^{c}	3.16 ± 0.50^{a}	7.86 ± 0.81^{b}
3	4.72 ± 1.29^{c}	2.55 ± 0.48^{a}	3.52 ± 0.69^{b}
4	3.92 ± 0.23^{b}	2.25 ± 0.52^{a}	3.72 ± 0.22^{b}
5	4.56 ± 0.27^{c}	1.87 ± 0.50^{a}	3.64 ± 0.29^{b}
6	6.56 ± 0.22^{c}	1.31 ± 0.16^{a}	3.45 ± 0.35^{b}
7	4.32 ± 0.46^{c}	0.82 ± 0.56^{a}	3.45 ± 0.35^{b}
8	4.40 ± 0.33^{c}	1.15 ± 0.56^{a}	3.56 ± 0.73^{b}
9	4.98 ± 0.44^{c}	0.72 ± 0.13^{a}	3.55 ± 0.32^{b}
10	5.36 ± 0.40^{c}	0.06 ± 0.35^{a}	3.52 ± 0.34^{b}
11	4.86± 0.24^{c}	0.38 ± 0.74^{a}	3.51 ± 0.53^{b}
12	5.55 ± 0.48^{c}	0.09 ± 0.34^{a}	3.66 ± 0.26^{b}
13	6.24 ± 0.15^{c}	0.53 ± 0.37^{a}	3.67 ± 0.29^{b}
14	5.88 ± 0.32^{c}	0.05 ± 0.35^{a}	3.61 ± 0.32^{b}



ภาพที่ 10 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสาย ที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน

(◆) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์

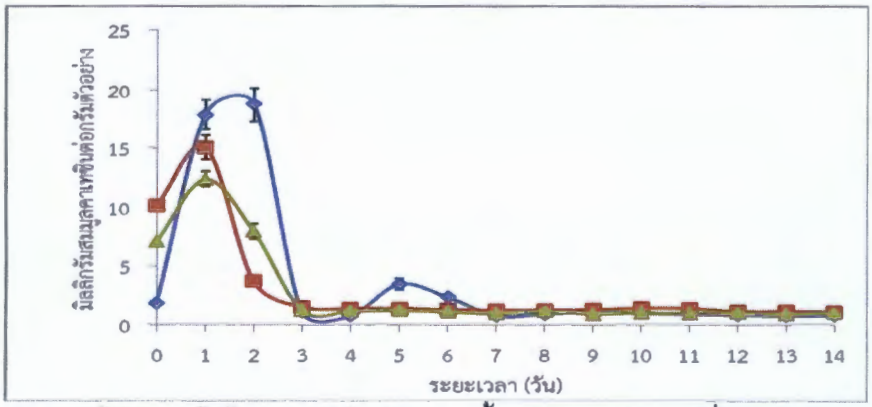
(■) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์

(▲) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

ผลการตรวจวัดปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินของตัวอย่างน้ำหมักกลีบและเกสรของดอกบัวสายสีชมพู ที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน โดยค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลของสารละลายมาตรฐานคาเทชิน เมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินในตัวอย่างน้ำหมักกลีบและเกสรของดอกบัวสายสีชมพู พบว่า น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 กับ 18 องศาบริกซ์ และน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 กับ 15 องศาบริกซ์ มีปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินไม่แตกต่างกัน ส่วนน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 และ 20 องศาบริกซ์ มีปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยในช่วงวันที่ 1-2 ของการหมักน้ำหมักทั้งสามชุดมีปริมาณแอนโทไซยานิดินเพิ่มขึ้น แล้วลดลงในวันที่ 3 จนสิ้นสุดการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 11

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินในน้ำหมักกลีบและเกสรของดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15, 18 และ 20 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลา 14 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดิน (มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมตัวอย่าง)		
	15°Brix	18°Brix	20°Brix
0	1.83 ± 0.10^{a}	10.15 ± 0.16^{c}	7.11 ± 0.27^{b}
1	17.85 ± 1.26^{a}	15.08 ± 1.00^{ab}	12.39 ± 0.64^{a}
2	18.75 ± 1.46^{b}	3.72 ± 0.37^{a}	7.96 ± 0.62^{a}
3	1.10 ± 0.31^{a}	1.52 ± 0.17^{b}	1.22 ± 0.15^{a}
4	0.78 ± 0.21^{a}	1.39 ± 0.24^{b}	1.17 ± 0.14^{b}
5	3.46 ± 0.46^{b}	1.40 ± 0.16^{a}	1.22 ± 0.15^{a}
6	2.36 ± 0.10^{c}	1.29 ± 0.14^{b}	1.10 ± 0.13^{a}
7	0.79 ± 0.11^{a}	1.24 ± 0.13^{c}	0.97 ± 0.10^{b}
8	0.94 ± 0.13^{a}	1.27 ± 0.19^{b}	1.18 ± 0.32^{ab}
9	1.16 ± 0.25^{b}	1.29 ± 0.07^{b}	0.94 ± 0.06^{a}
10	1.01 ± 0.04^{a}	1.43 ± 0.18^{c}	1.05 ± 0.22^{b}
11	0.95 ± 0.15^{a}	1.41 ± 0.25^{b}	0.97 ± 0.15^{a}
12	0.86 ± 0.10^{a}	1.15 ± 0.10^{c}	1.01 ± 0.06^{b}
13	0.79 ± 0.08^{a}	1.16 ± 0.07^{c}	0.91 ± 0.12^{b}
14	0.85 ± 0.21^{a}	1.12 ± 0.30^{a}	1.06 ± 0.12^{a}



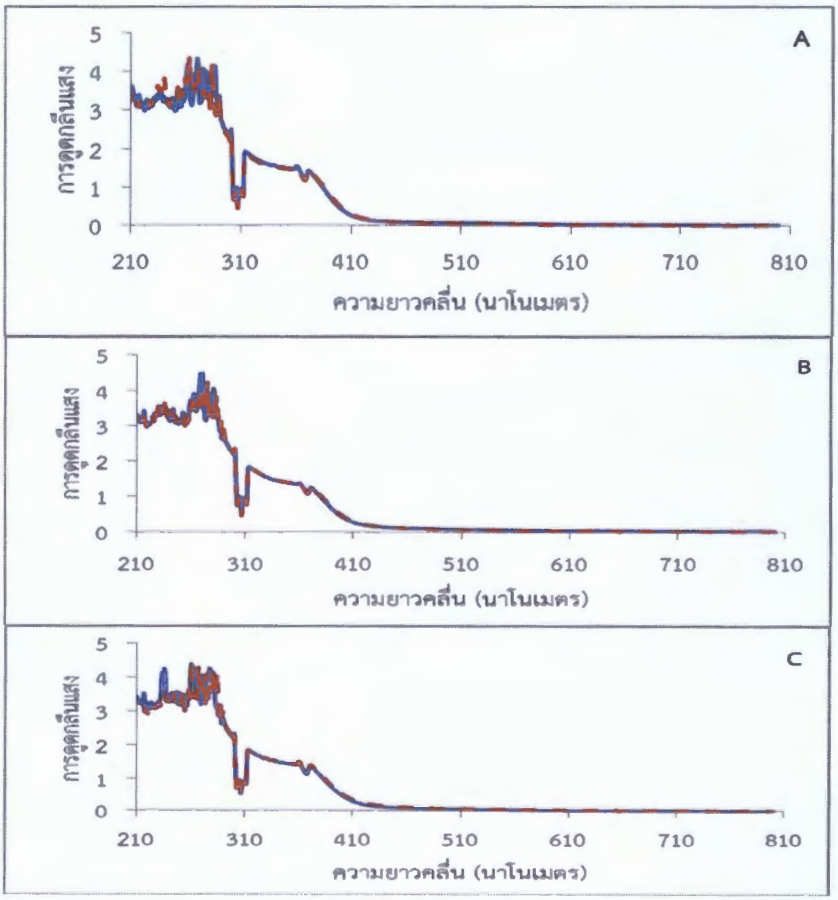
ภาพที่ 11 ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลา 14 วัน

(◆) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์

(■) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์

(▲) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

จากการตรวจวัดปริมาณแอนโทไซยานินของตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายทั้งสามชุดที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน พบว่าตัวอย่างทั้งสามชุด ไม่มีปริมาณแอนโทรไซยานินอยู่ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากพีค (peak) ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ของตัวอย่างน้ำหมักกลีบและเกสรของดอกบัวสายสีชมพู ที่เจือจางด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.0 และสารละลายโซเดียมอะซิเตรตที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของ Cyanidin-3-Glucoside ที่ใช้เป็นแอนโทไซยานินมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินของตัวอย่างตามวิธีของ Monica และ Ronald (2001) ไม่ปรากฏพีค (peak) ใดๆ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.0 และ 4.5

ภาพ A คือ น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์

ภาพ B คือ น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์

ภาพ C คือ น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

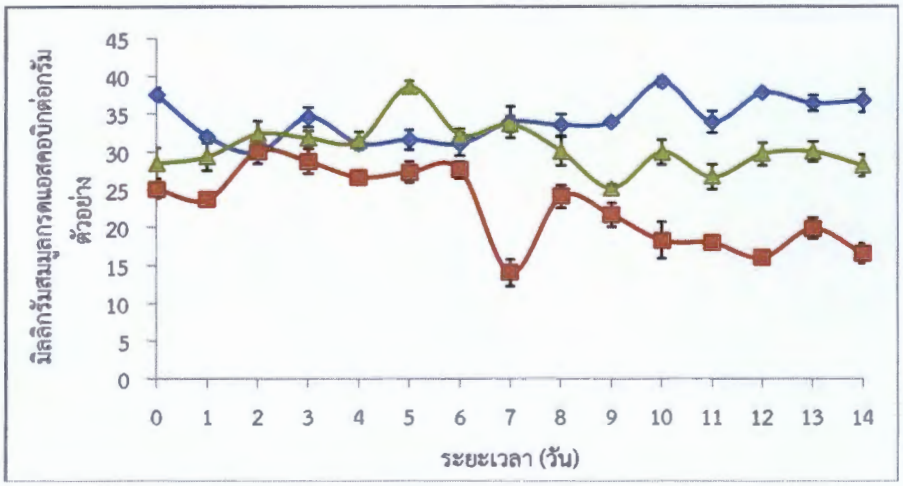
(——) ตัวอย่างในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.0

(- -) ตัวอย่างในโซเดียมอะซิเตรตที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

4. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำหมักของดอกบัวที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน ด้วยวิธี DPPH โดยใช้กรดแอสคอบิคเป็นสารละลายมาตรฐานและแสดงค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระในหน่วยของสมมูลของกรดแอสคอบิค (Vit C Equivalent Antioxidant Capacity: VEAC) ดังแสดงในภาพที่ 13 พบว่า น้ำหมักของดอกบัวสายที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15, 18 และ 20 องศาบริกซ์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ ให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 36.80±1.50 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอบิคต่อกรัมตัวอย่าง ในวันที่ 14 ของกระบวนการหมัก รองลงมาคือน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 และ 18 องศาบริกซ์ ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 28.20±1.44 และ 16.60±1.32 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอบิคต่อกรัมตัวอย่าง



ภาพที่ 13 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน

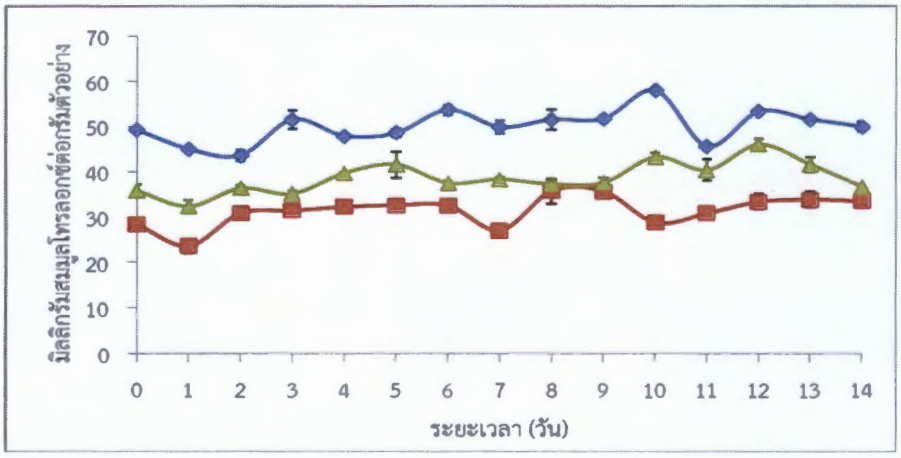
(◆) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์

(■) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์

(▲) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

615.19
ส731ผ
ช.4
354977

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำหมักของดอกบัวสาย ที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน ด้วยวิธี ABTS โดยใช้สารโทรลอกซ์เป็นสารละลายมาตรฐาน และแสดงค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระในหน่วยของสมมูลของโทรลอกซ์ ดังแสดงในภาพที่ 14 พบว่า น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ส่วนน้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 และ 18 องศาบริกซ์ ให้ค่ารองลงมา คิดเป็น 49.91±1.14, 36.61±0.23 และ 33.44±1.49 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ในวันที่ 14 ของกระบวนการหมักตามลำดับ



ภาพที่ 14 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ในตัวอย่างน้ำหมักดอกบัวสายที่ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน

(—◆—) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์
(—■—) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์
(—▲—) น้ำหมักที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากดอกบัวสายพบว่าหากทำการสกัดด้วยเอทานอลที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่หาได้ง่ายและมีความเป็นพิษต่ำ สามารถใช้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 60 ถึง 80 จะให้ผลการสกัดที่มีทั้งปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่มีอยู่ในดอกบัวสายเป็นสารที่ชอบละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง จึงทำให้สามารถสกัดสารฟีนอลลิกทั้งหมดออกมาได้ในปริมาณที่สูงแตกต่างจากระดับความเข้มข้นอื่น ดังนั้นเมื่อเลือกระดับความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 60 มาทำการสกัดดอกบัวที่มีสีแตกต่างกัน พบว่า ดอกบัวสายสีแดงมีสารประกอบฟีนอลลิกสูงที่สุด 17.60±1.14 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามดอกบัวสีเหลืองกลับให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่มีอยู่ในดอกบัวสีเหลืองนั้นถึงแม้จะถูกสกัดออกมาได้น้อยกว่าแต่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าซึ่งอาจเป็นสารคนละชนิดกับที่มีอยู่ในดอกบัวสายสีแดง สำหรับการสกัดสารจากดอกบัวสายโดยการใช้การหมักทางชีวภาพด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgundy นั้นมีแนวโน้มคงที่ทั้งในเรื่องปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งทั้งปริมาณสารสำคัญโดยเฉพาะปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดจะให้ผลสัมพันธ์ในด้านปริมาณกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่สำหรับการหมักไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในด้านปริมาณสารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ยีสต์ก็ยังสามารถที่จะเจริญเติบโตและสร้างแอลกอฮอล์ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดที่ได้นั้นยังมีความเข้มข้นน้อยจึงไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของยีสต์ และแอลกอฮอล์ที่เชื้อยีสต์ผลิตขึ้นมาได้ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดหนึ่งก็ไม่แสดงให้เห็นถึงปริมาณของสารสำคัญหรือฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน ทั้งนี้หากนำสารสกัดไปทำให้เกิดความเข้มข้นและทำการทดสอบเพิ่มเติมอาจจะให้ผลที่มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากดอกบัวสายที่ผ่านกระบวนการสกัดแบบต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถสรุปได้ว่าสามารถทำการสกัดดอกบัวสายด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 จะให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดิน นั้นไม่มีความแตกต่างกันในเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน สำหรับการใช้การหมักทางชีวภาพไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในระยะเริ่มต้น

ผลผลิต

ผลงานอยู่ในระหว่างการเรียบเรียงเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานในระดับชาติและนานาชาติ และนำผลการวิจัยไปวิเคราะห์เพื่อหาทางต่อยอดเพื่อการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับดอกบัวสายต่อไป

บรรณานุกรม

Gamez, E. J. C., Luyengi, L., Lee, S. K., Zhu, L.-F., Zhou, B.-N., Fong, H. H. S., et al. 1998. Antioxidant Flavonoid Glycosides from Daphniphyllum calycinum1. Journal of Natural Products, 61(5), 706-708.

Huabbangyang, O., Buanong, M., Wongs-Aree, C., Techavutthiporn, C.& Srilaong, V. 2010. Study of Nutritional and Free Radical Scavenging Activity in Edible Flowers. Journal of Agricultural Scienc. 41, 381-384.

Manlan, Z., Xuchen, Z., Qingyan, S., Hui, L., Peixing, Z., Huijin, Z., Yanjun, X., Lijin, W., & Liangsheng, W. 2012. Relationship between the Composition of Flavonoids and Flower Colors Variation in Tropical Water Lily (Nymphaea) Cultivars. *PLoS ONE 7(4)* : e34335.

Mengcheng, T., Jianming, W., & Zhishen, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoide radicals. *Journal of Food Chemistry*, 64, 555-559.

Monica M.G. and Ronald E.W. 2001. Characterzation and Measurement of Anthocyanins by Uv-Visible Spectroscoscopy. Protocols in Food Analytical Chemistry, F1.2.1-F1.2.13.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Atioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine,* 26, 1231-1237

Rice-Evans C.A., Miller, N. J. & Paganga, G. 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. Trend in Plant Science. 2, 152-159.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology, 82*(2), 291-295.

Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total Phenols and Otheroxidation Substrates and Antioxidant by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In L. Pacher (Ed.). *Methods in Enzymology oxidants and Anitioxidants Part A*, 299, 152-178.

Sun B., Ricardo-da-silva M.J. and Spranger Isabel. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem.* (46) 4267-4274.

กมลวรรณ เตชะวณิช. 2554. *คู่มือปลูกและดูแลบัว ราชินีไม้น้ำประดับสวนสวย*. กรุงเทพฯ. ไทยควอลิตี้บุ๊คส์. 128 หน้า.

กลีบดอกบัวสาย. 2554. วันที่ค้นข้อมูลดุลาคม, 2555, เข้าถึงได้จาก http://ayattin.files.wordpress.com/2011/08/e0b898e0b8b1e0b88de0b881e0b8b2e0b8a4.jpg

กลีบเลี้ยงบัวสาย. 2555. วันที่ค้นข้อมูลธันวาคม 30, 2556, เข้าถึงได้จาก http://diarylove.com/forum_posts.asp?TID=11700

ก้านดอกบัวสายหรือสายบัว. 2552. วันที่ค้นข้อมูลธันวาคม 30, 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.monmai.com/บัวสาย/

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์, 1*, 59-70.

ไชยา อุ้ยสูงเนิน และลาวัลย์ ฉัตรวิรุฬห์. 2548. *การปลูกบัว*. นนทบุรี: ฐานเกษตรกรรม. 94 หน้า

ดอกบัวสาย. 2551. วันที่ค้นข้อมูลธันวาคม 30, 2556, เข้าถึงได้จาก http://board.trekkingthai.com/board/show.php?forum_id=18&topic_no=140442&topic_id=142197

ใบบัวสาย. (ม.ป.ป.). วันที่ค้นข้อมูลธันวาคม 30, 2556, เข้าถึงได้จาก http://2553waw.wordpress.com/งานอดิเรก/ลักษณะทางพฤกษศาสตร์/244-2/

รัตนา เฉลิมกลิ่น. 2552. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของบัวที่นิยมปลูกเป็นการค้า. *วารสารวิชาการจันทรเกษมสาร*, 14, 46-54.

สุปราณี วนิชชานนท์. 2540. *บัวประดับ*. กรุงเทพฯ. เพื่อนเกษตร. 134 หน้า.

สมนึก ยิ้มย่อง, อภิรดี อุทัยรัตนกิจ, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, นวลฉวี เวชประสิทธิ์, ณนพชัย ชาญศิลป์ และเฉลิมชัย วงษ์อารี. 2552. การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากกลีบดอกบัวในกลุ่มอุบลชาติ. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 40(3), 355-358.

สมนึก ยิ้มย่อง, อภิรดี อุทัยรัตนกิจ, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, นวลฉวี เวชประสิทธิ์, ณนพชัย ชาญศิลป์ และเฉลิมชัย วงษ์อารี. 2553. ความต้านทานอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในสารสกัดจากกลีบดอกบัวสุธาสิโนบล. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 40(3), 41-44

ไหลบัว. 2551. วันที่ค้นข้อมูลธันวาคม 30, 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.oknation.net/blog/jarinasa/2013/05/21/entry-1

รายงานสรุปการเงิน

รหัสโครงการ 2555A10862009

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา

ศักยภาพของสารสกัดจากดอกบัวสายที่ผ่านกระบวนการสกัดแบบต่าง ๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซนานิน ปริมาณโปรแอนโทไซยานิดินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย/ผู้รับทุน อ.ดร.สิริเชษฐ์ รัตนะชิตธวัช

รายงานในช่วงตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2554 ถึงวันที่ กันยายน พ.ศ. 2555

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี - เดือน ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2554 ถึงวันที่ กันยายน พ.ศ. 2555

รายจ่าย

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ
1. ค่าจ้าง	23,820	71,460	95,280	95,280	-
2. ค่าตอบแทน	-	-	26,000	26,000	-
3. ค่าใช้สอย	10,000	10,000	20,000	30,000	10,000
4. ค่าวัสดุ	10,000	88,720	98,720	108,720	10,000
รวม	43,820	170,180	240,000	260,000	20,000

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ 260,000 บาท เมื่อ มิถุนายน พ.ศ. 2555

รวม **260,000 บาท**

....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

หัวหน้าโครงการวิจัย(แทน)