



การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย
และการยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

โดย

นางสาวสมฤทัย ทรัพย์เจริญพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาศรีเบื้องต้นในการดำเนินอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย
และการยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน

โดย

นางสาวสมฤทัย ทรัพย์เจริญพันธ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**PRELIMINARY STUDY ON ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL AND
ANTICANCER ACTIVITY OF LOCAL MEDICINAL PLANTS**

By

Somrutai Supcharoenpun

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Biotechnology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2009

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย และการยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน” เสนอโดย นางสาวสมฤทัย ทรัพย์เจริญพันธ์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา
2. รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์
คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุวัฒนา พุกกะศรี)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ดร.นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา)
...../...../.....

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)
...../...../.....

50401206 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ / การยับยั้งแบคทีเรีย / ความเป็นพิษต่อเซลล์

สมฤทัย ทรัพย์เจริญพันธ์ : การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย และการยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ. ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา, รศ. ดร.กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ และ ผศ. ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์. 113 หน้า.

ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นขี้หนอนถูกประเมินค่าด้วยวิธี DPPH FRAP และ DNA protection และหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu จากนั้นเลือกสารสกัดที่ให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดไปหาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียและตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Paper discs method และ MTT ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบของตัวอย่างพืชทุกชนิดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่ใช้เฮกเซนและน้ำร้อนเป็นตัวทำละลาย โดยสารสกัดจากเปลือกต้นเพกามีฤทธิ์ในการจับกับอนุมูลอิสระ การเป็นตัวรีดิวซ์ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (EC_{50} เท่ากับ 8.88 ± 0.15 ไมโครกรัม crude extracts/ มิลลิลิตรของ DPPH, 61.46 ± 0.15 มิลลิกรัม GAE/ กรัม crude extracts, 69.95 ± 2.66 มิลลิกรัม GAE/ กรัม crude extracts ตามลำดับ) นอกจากนี้ สารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืชทดสอบทั้งหมดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายยังมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่คัดเลือกมาทดสอบ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ พบว่า สารสกัดหยาบจากรากผักหนามมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) สูงที่สุด คือ มี IC_{50} เท่ากับ 397 ± 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกต้นเพกา มี IC_{50} เท่ากับ 470 ± 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย และการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

50401206 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS : ANTIOXIDANTS / ANTIMICROBIAL / CYTOTOXICITY

SOMRUTAI SUPCHAROENPUN : PRELIMINARY STUDY ON ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER ACTIVITY OF LOCAL MEDICINAL PLANTS. THESIS ADVISORS : ASST. PROF. BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph. D., ASSOC. PROF. KALYANEE JIRASRIPONGPUN, Ph. D., AND ASST. PROF. PHIMCHANOK JATURAPIREE, Ph. D., 113 pp.

The antioxidant capacity of crude extracts from bark of *Oroxylum indicum* (L.) Vent., root of *Leucaena leucocephala* de wit, root of *Lasia spinosa* Thw. and root of *Uraria crinita* (L.) Desv. ex D.C. were measured by DPPH, FRAP and DNA protection assays. Total phenolic content was also determined by the Folin–Ciocalteu method. The crude extracts with high antioxidant capacity were further evaluated for antimicrobial and cytotoxicity by paper disc method and MTT assay, respectively. On the whole, ethanol extracts revealed strong antioxidant capacity in correlation with high total phenolic content as compared to hexane and hot water extracts. The highest DPPH radical-scavenging activity, ferric reducing antioxidant power as well as total phenolic contents were found in the ethanol extract from bark of *O. indicum* (L.) Vent ($EC_{50} = 8.88 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ DPPH, $61.46 \pm 0.15 \text{ mg GAE/g}$, $69.95 \pm 2.66 \text{ mg GAE/g}$, respectively). In addition, ethanol extracts from all plant samples also showed antimicrobial activity against the selected Gram- positive bacteria strains. For cytotoxicity test, ethanol extract from root of *L. spinosa* Thw. revealed the highest toxicity on HeLa cell with the IC_{50} at $397 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$, while the extract from bark of *O. indicum* (L.) Vent was at $470 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$. These medicinal plant materials provided promising compound in the ethanol extract with antioxidant capacities, antimicrobial and anticancer activity.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2009

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2. 3.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของผศ. ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือในหลายสิ่งหลายอย่างจนกระทั่งลุล่วงไปได้ด้วยดี พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ ผศ. ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และ ดร.นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบและให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ได้มอบวิชาความรู้และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณทิพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ คุณประไพ บางเขย คุณนุชนาฏ เลี้ยงอำนาจ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

คุณความดีหรือประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บุพการี ผู้มีพระคุณทุกท่านและครูอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัยมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์การศึกษา	2
ขอบเขตการศึกษา.....	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
พืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	3
อนุมูลอิสระ (Free radicals).....	12
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant).....	13
วิธีวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	15
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds).....	18
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย.....	21
การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	26
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	28
สารเคมีและอุปกรณ์.....	28
วิธีการทดลอง	31
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	36
5 สรุปผลการทดลอง	70
บรรณานุกรม	71

	หน้า
ภาคผนวก	76
ภาคผนวก ก.....	77
ภาคผนวก ข.....	84
ภาคผนวก ค.....	92
ภาคผนวก ง	96
ภาคผนวก จ	100
ภาคผนวก ฉ.....	102
ภาคผนวก ช.....	105
 ประวัติผู้วิจัย	 113

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ	23
2	pH ของสารละลายสกัดหยาบจากตัวอย่างพืชที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water	36
3	ลักษณะของ crude extracts หลังระเหยเอา solvent ออก	37
4	ปริมาณผลผลิต (yield) ของ crude extracts หลังระเหยเอา solvent ออก	39
5	EC ₅₀ ของ crude extracts ที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water.....	45
6	ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของ crude extracts ที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water.....	46
7	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ crude extracts ที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water.....	54
8	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ของ ethanol extracts	57
9	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย <i>B. cereus</i> ของ ethanol extracts	57
10	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ของ ethanol extracts.....	58
11	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. enteritidis</i> ของ ethanol extracts	58
12	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. typhimurium</i> ของ ethanol extracts.....	59
13	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย <i>E. coli</i> ของ ethanol extracts.....	59
14	ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (HeLa) และเซลล์ปกติ (Vero) ของ ethanol extracts	66
15	ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1).....	86
16	%Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1) ...	86
17	ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 2).....	87
18	%Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 2) ...	87
19	ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 3).....	88
20	%Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 3) ...	88
21	%Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (ผลจากการสกัดทั้ง 3 ครั้ง).....	89
22	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 nm.....	89
23	ค่าการดูดกลืนแสงของ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา ที่เวลา 210 นาที.....	90

ตารางที่		หน้า
24	%DPPH ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	90
25	ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความยาวคลื่น 593 nm.....	93
26	ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts.....	94
27	ความเป็น reducing power ของ ethanol extracts.....	95
28	ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความยาวคลื่น 760 nm	97
29	ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts	98
30	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ ethanol extracts.....	99
31	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/ml) ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 (600 nm).....	101
32	ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ HeLa ที่ทดสอบกับ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา.....	103
33	%ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa ที่ทดสอบกับ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา	103

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ฝักเพกา	3
2	กระถิน	6
3	ฝักหนาม	8
4	จี๋หนอน	10
5	วงจรการเกิด ROS (Reactive Oxygen Species) ชนิดต่างๆ	13
6	วงจรการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	14
7	โครงสร้างของ DPPH ที่อยู่ในรูป free radical และ nonradical	16
8	สีของสารละลาย DPPH ที่เปลี่ยนไป เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก.....	16
9	การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH radical กับ สารต้านอนุมูลอิสระ.....	16
10	สีของสารละลาย FRAP ที่เปลี่ยนไป เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก.....	17
11	ปฏิกิริยาการเกิด hydroxyl radical	18
12	โครงสร้างของ hydroxybenzoic (1) และ hydroxycinnamic acid (2)	19
13	โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoid.....	20
14	สีของสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent ที่เปลี่ยนไป เมื่อเติม สารต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นต่างๆ	20
15	การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี paper discs method	21
16	ตำแหน่งที่หยดเชื้อแบคทีเรียลงบนวุ้นกึ่งแข็งที่ผสมสารทดสอบ.....	22
17	โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ	23
18	HeLa cells.....	27
19	Vero cells.....	27
20	ตัวอย่างพืชตากแห้งที่ใช้สำหรับเตรียมสารสกัด	31
21	ตัวอย่างพืชตากแห้งบดละเอียด	32
22	สีของ crude extracts หลังระเหยเอา solvent ออก	38
23	ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระของ crude extracts ที่ใช้ hexane (1) ethanol (2) และ hot water (3) เป็น solvent.....	42

ภาพที่		หน้า
24	ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระของ crude extracts ที่ใช้ ethanol เป็น solvent ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	43
25	ปริมาณ DPPH ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยากับ crude extracts ที่ใช้ hexane (1) ethanol (2) และ hot water (3) เป็น solvent.....	44
26	ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของตัวอย่างพืชตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไป ที่ใช้ ethanol เป็น solvent.....	49
27	ดีเอ็นเอที่ผสมกับ ethanol extracts เมื่อถูกทำลายด้วยสารละลาย Fenton's reagent.....	51
28	ดีเอ็นเอที่ผสมกับ ethanol extracts เมื่อถูกทำลายด้วยสารละลาย Fenton's reagent.....	52
29	ลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i>	60
30	ลักษณะของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ที่เจริญบนอาหารวุ้นกึ่งแข็งที่ผสม ethanol extracts จากตัวอย่างพืชชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1000	
31	ไม่ ไรโรกรัม/มิลลิเมตร.....	63
31	ลักษณะของแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ที่เจริญบนอาหารวุ้นกึ่งแข็งที่ผสม chloramphenicol	63
32	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa (1) และ Vero (2) ของ ethanol extracts	67
33	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ของ gallic acid	68
34	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ	89
35	%DPPH ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	91
36	ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	93
37	ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	97
38	%ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa ที่ทดสอบกับ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา	104

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโลกมีความก้าวหน้าทางด้านอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีมากขึ้น ส่งผลให้เรามีพฤติกรรมการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนไป ต้องเจอกับสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษมากกว่าแต่ก่อน รวมถึงผลจากสภาวะโลกร้อน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) ตัวการที่ก่อให้เกิดโรคร้ายต่างๆ มากมาย เช่น ทำให้แก่เร็ว โรคความจำเสื่อม และโรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้นประชาชนและองค์กรต่างๆ จึงให้ความสนใจเกี่ยวกับการดูแลสุขภาพมากขึ้น การหันมาบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เช่น ผักและผลไม้บางชนิด รวมไปถึงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทั้งในรูปแบบอาหารเสริม เครื่องดื่ม และเครื่องสำอาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มาจากสมุนไพรนั้นนับเป็นอีกทางเลือกที่ผู้คนให้ความสนใจกันเป็นอย่างมาก เพราะเชื่อว่า อาหารและผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทำให้ผู้ประกอบการต่างแสวงหาสมุนไพรแหล่งใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงและหาได้ง่ายในท้องถิ่นมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากขึ้น เนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูก

เปลือกต้นเพกา รากต้นกระดิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์ เป็นพืชสมุนไพรที่มีการกล่าวอ้างถึงสรรพคุณในการรักษาโรคมะเร็ง ที่ใช้กันในบางท้องถิ่นของประเทศไทย ซึ่งข้อมูลในเชิงวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสรรพคุณของพืชสมุนไพรเหล่านี้ยังมีอยู่น้อย โดยเฉพาะในส่วนของรากต้นกระดิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์ ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันและพิสูจน์ความเชื่อดังกล่าว ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ การต่อต้านแบคทีเรีย และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดนี้ โดยเริ่มจากการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยการหาประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (Scavenging effect) ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing power) และการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ (DNA protection) จากนั้นหาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด และตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของสารที่สกัดได้ด้วย

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อหาทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอน
2. เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอน
3. เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอน

ขอบเขตของการศึกษา

1. หาดั้วทำละลาย (Solvent) ที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างพืชต่างๆ โดยใช้เฮกเซน (Hexane) เอทานอล (Ethanol) และน้ำร้อน (Hot water)
2. หาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอนในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการหาประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (Scavenging effect) ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing power) และการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ (DNA protection)
3. หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอน
4. หาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด โดยวิธี Paper discs method และ MIC test (Minimum inhibition concentration test)
5. ตรวจสอบความเป็นพิษและหาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี MTT

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ และความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอน ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พืชที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 เพกา

เพกา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oroxylum indicum* (L.) Vent. อยู่ในวงศ์ Bignoniaceae มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่นต่างๆ เช่น ภาคกลาง เรียก เพกา ภาคเหนือ เรียก มะลิค ไม้ มะลิ้น ไม้ ภาคอีสาน เรียก หมากลิ้นฟ้า หมากลิ้น ไม้ บักลิ้นงู

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นสูง 3-12 เมตร เปลือกเรียบ ใบเป็นใบประกอบยาว 30-120 เซนติเมตร มีใบย่อยจำนวนมาก รูปร่างคล้ายรูปไข่ ปลายใบแหลม ใบกว้าง 4-8 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อใหญ่ยาว 50-150 เซนติเมตร ดอกย่อยมีสีม่วงแดง ผลเป็นฝักแบนยาวคล้ายดาบ กว้าง 6-15 เซนติเมตร ยาว 60-120 เซนติเมตร ภายในมีเมล็ดแบนและมีเยื่อบางๆ อยู่ล้อมรอบ ดังภาพที่ 1 (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน 2538)



ภาพที่ 1 ฝักเพกา (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน 2538)

สรรพคุณทางยา เพกาเป็นพืชที่มีการใช้เป็นยาสมุนไพรมาแต่โบราณ โดยตำรายาแผนโบราณกล่าวไว้ว่ามีสรรพคุณต่างๆ ดังนี้

เปลือกต้น ช่วยดับพิษโลหิต ขับลมในลำไส้ แก้ท้องร่วง แก้บิด ขับเสมหะ บำรุงโลหิต นอกจากนี้ยังสามารถลดอาการบวม ฟกช้ำ อาการอักเสบ สมานแผล หรือรักษาฝีได้โดยนำไปฝนกับน้ำปูนใสทาบริเวณที่มีอาการ ซึ่งในส่วนของเปลือกจะพบสาร baicalein, chrysin และ 6-methylbaicalein

ราก ช่วยให้เจริญอาหาร บำรุงธาตุ แก้ท้องร่วง แก้บิด รากฝนกับน้ำปูนใสสามารถนำมาทาแก้อาการอักเสบ ฟกช้ำได้ และสารสำคัญที่พบในส่วนนี้ได้แก่ D-galactose, baicalein และ sitosterols

ฝักอ่อน ช่วยขับลม และบำรุงธาตุ

เมล็ด เป็นยาระบาย นอกจากนี้ น้ำต้มจากเมล็ดสดยังช่วยลดอาการไอ ขับเสมหะ และน้ำต้มจากเมล็ดแก่ที่แห้ง (น้ำจับเลี้ยง) ใช้ต้มแก้ร้อนในได้

ใบ มีสาร aloe-emodin เมื่อนำมาคั้นน้ำดื่ม แก้ปวดข้อ แก้ปวดท้อง และช่วยเจริญอาหาร

แก่น พบสารสำคัญคือ prunetin และ β -sitosterol (สุนทรีย์ สิงหนุตตรา 2535)

จากรายงานการวิจัยฝักพื้นบ้านของไทยจำนวน 484 ชนิดพบว่า เพกาเป็น 1 ใน 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็งสูงสุดและสามารถป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ดี เนื่องจากในฝักเพกามีวิตามินซีและเอสูงถึง 484 และ 8221 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ (ธีราพร ทัสพร 2547) และยังมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับเพกากับมากมาย ทั้งการต่อต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านการอักเสบ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และมีการแยกหาสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบในเพกา ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าเพกาอาจมีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ ดังนี้

Murakami และคณะ (1995) ได้ศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านเนื้องอก (Tumor cell) ภายใต้อาหาร *In vitro* ของสารสกัดที่ใช้เมทานอล (Methanol) เป็นตัวทำละลายจากพืชกินได้ (Edible plant) ในประเทศไทยจำนวน 112 ชนิด พบว่า ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของพืชที่สุ่มคัดเลือกมาทดสอบ ซึ่งก็รวมถึงสารสกัดจากฝักอ่อนของเพกาสามารถยับยั้งการกระตุ้น epstein-Barr virus (EBV) ใน human B-lymphoblastoid cells (Raji cells) ที่ถูกชักนำด้วย 12-O-hexadecanoylphorbol-13-acetate (HPA) ความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัดจากฝักอ่อนของเพกามีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า 70%

Laupattarakasem และคณะ (2003) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการอักเสบของสมุนไพรไทย 4 ชนิด ได้แก่ เปลือกต้นเพกา (*Oroxylum indicum*) ใบเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus*) ลำต้นเถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani*) และลำต้นเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens*) โดยใช้ระบบ *In vitro* ที่แตกต่างกัน 3 ระบบ พบว่า สารสกัด (Aqueous extract) จากลำต้นเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ดีที่สุด โดยให้ผลดีในทุกระบบที่ใช้ทดสอบ ส่วน aqueous extract ของเปลือกต้นเพกาไม่แสดงฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบในระบบที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นการแสดงฤทธิ์ในการลดการหลั่งของ myeloperoxidase (MPO)

จาก rat peritoneal leukocytes ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการอักเสบได้ 64% สำหรับ aqueous extract ของใบเหียงกปลาหมอและลำต้นเถาเอ็นอ่อนแสดงฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Costa-Lotufu และคณะ (2005) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการต่อต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในประเทศบังกลาเทศ 11 ชนิด ซึ่งรวมถึงเปลือกต้นเพกาด้วยการทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ต่อ tumor cell lines ต่างๆ ด้วยวิธี MTT พบว่า เปลือกต้นเพกาที่สกัดด้วย Ethanol 100 เปอร์เซ็นต์มีฤทธิ์สูงสุดในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง โดยให้ค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) ต่ำกับทุก tumor cell line ที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ ให้ค่าเท่ากับ 19.6, 14.2, 17.2 และ 32.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับเซลล์ CEM (Leukemia), HL-60 (Leukemia), B-16 (Murine melanoma) และ HCT-8 (Human colon carcinoma) ตามลำดับ ซึ่งการหาสารออกฤทธิ์หลักในเปลือกต้นเพกาที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวนี้เป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องศึกษากันต่อไป

Babu และคณะ (2005) ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของสาร Oroxylin A เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านแบคทีเรีย เนื่องจากมีรายงานว่า oroxylin A ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในเพกามีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ ลดอาการแพ้ และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ซึ่งจากการทดสอบด้วยการหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentrations) พบว่า 7-oacyl derivatives of oroxylin A สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* (MTCC 441), *Bacillus sphaericus* (MTCC 11) และ *Staphylococcus aureus* (MTCC 96) และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Chromobacterium violaceum* (MTCC 2656), *Klebsiella aerogenes* (MTCC 39) และ *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 741) ได้เช่นเดียวกับ oroxylin และยังแสดงฤทธิ์ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย

Babu และคณะ (2006) ได้สังเคราะห์ chrysin analogues (7-O-alkylamino derivatives of chrysin) เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านแบคทีเรีย เนื่องจากมีรายงานว่า chrysin (5,7-dihydroxy flavone) ที่พบในเพกามีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น ต่อด้านมะเร็ง ต่อด้านการอักเสบ และลดอาการแพ้ เป็นต้น และจากการทดสอบด้วยการหาค่า MIC พบว่า 7-O-alkylamino derivatives สามารถยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* (MTCC 441), *Bacillus sphaericus* (MTCC 11) และ *Staphylococcus aureus* (MTCC 96) และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Chromobacterium violaceum* (MTCC 2656), *Klebsiella aerogenes* (MTCC 39) และ *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 741) ได้เช่นเดียวกับเช่นเดียวกับ chrysin

Kalaivani และ Mathew (2009) ได้ประเมินความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของ

สารสกัดจากเปลือกพริกที่สกัดด้วยปิโตรเลียม อีเธอร์ (Petroleum ether) เบนซีน (Benzene) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เอทานอล (Ethanol) และน้ำ (Water) พบว่า การสกัดด้วย ethanol และ chloroform มีแนวโน้มในการจับกับอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นๆ โดยสารที่สกัดด้วย ethanol แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี β -carotene bleaching ในขณะที่สารที่สกัดด้วย chloroform แสดงความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power) ได้สูงสุด ซึ่งศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน เป็นเพราะความหลากหลายของสารออกฤทธิ์ในพืช (Phytochemical) ที่สกัดได้จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

1.2 กระถิน

กระถิน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Leucaena leucocephala* de wit จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่นต่างๆ เช่น ภาคกลาง เรียก กระถินไทย ภาคใต้ เรียก สะตอเทศ สะตอเบา

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงไม้พุ่มขนาดใหญ่ สูงได้ถึง 10 เมตร ใบเป็นใบประกอบ ก้านใบยาว 15-30 เซนติเมตรแตกออกเป็นก้านย่อย 3-10 คู่ ก้านยาวกว่า 10 เซนติเมตร มีใบขนาดเล็กคล้ายใบมะขามจำนวน 5-20 คู่ ใบเป็นรูปขนานปลายแหลมยาว 6-21 มิลลิเมตร กว้าง 1.5-5 มิลลิเมตร ดอกเป็นช่อขนาดเล็ก กลมฟู สีขาว มีกลิ่นหอมเล็กน้อย ฝักแบน ยาว 12-18 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร มีเมล็ดภายใน 15-30 เมล็ด ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กระถิน (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน (2538))

สรรพคุณทางยา แตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆ ดังนี้

ฝัก มีสารแทนนินในปริมาณสูง สามารถรับประทานแก้ท้องร่วง ใช้สมานแผล หรือห้ามเลือดได้ น้ำต้มจากฝักสามารถล้างแผลแก้ผิวหนังและเยื่อเมือกอักเสบ หรือคั้นแก้โรคบิดได้

เมล็ด เป็นยาถ่ายพยาธิ เนื้อหุ้มเมล็ดใช้ตำแล้วนำมาพอกแก้ฝีหลายหัว และใช้แก่นึ่งออก

ราก มีรสฝาด ใช้ปรุงเป็นยาอายุวัฒนะ ขับลม ขับระดูขาว (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน 2538)

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับกระถินเกือบทั้งหมดจะให้ความสนใจเกี่ยวกับการนำกระถินไปเป็นอาหารสัตว์ แต่ก็มีบางรายงานการวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ทางยาของกระถิน ดังนี้

Murakami และคณะ (1995) ได้ศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้าน tumor cell ของสารสกัดจากพืชกินได้ในประเทศไทย 112 ชนิด พบว่า สารสกัดจากเมล็ดกระถิน 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการกระตุ้น epstein-Barr virus ใน human B-lymphoblastoid cells (Raji cells) ที่ถูกชักนำด้วย 12-O-hexadecanoylphorbol-13-acetate ความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่อนข้างต่ำคือ อยู่ในช่วง 30- 50%

Ono และคณะ (2003) ได้นำ galactomannans จากเมล็ด *Mimosa scabrella* และเมล็ดกระถินที่ผ่านการเติมหมู่ซัลเฟต (Sulfation) มาทดสอบการต่อต้าน yellow fever virus (BeH111 strain) และ dengue 1 virus (Hawaii strain) ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้เหลืองและไข้เลือดออก (Type I) พบว่า sulfated galactomannans จากพืชทั้ง 2 ชนิดสามารถลดการตายของหนูที่ได้รับไวรัสทั้งสองชนิดได้ดีในระดับที่ใช้ทดสอบ

Gamal-Eldeen และคณะ (2007) ได้ทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ polysaccharides ที่สกัดได้จากเมล็ดกระถินและอนุพันธ์ของ polysaccharides ที่ได้จากการดัดแปลงทางเคมี ได้แก่ C-glycosidic 2-propanol derivative (PE) และ sulphated derivative (SPE) โดยการศึกษาผลของสารเหล่านี้ต่อ raw macrophage 264.7 functions (Murine macrophage cell line) และหา antioxidant activity ของสาร ผลที่ได้พบว่า PE มีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ ได้แก่ hydroxyl, peroxy และ superoxide anion radicals ส่วน SPE สามารถจับกับ peroxy radical ได้ โดยทั้ง PE และ SPE ทำให้ macrophage เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและเกิด phagocytosis ของ FITC-zymosan โดย PE ยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO) และการหลั่ง tumor necrosis factor- α (TNF- α) ใน lipopolysaccharide (LPS) ที่จะไปกระตุ้นการเกิด raw macrophage 264.7 ส่วน SPE ไปชักนำการสร้าง NO และเพิ่มการหลั่ง TNF- α แสดงให้เห็นว่า PE มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบได้ และ SPE อาจมีบทบาทชักนำ macrophage functions ในการต่อต้าน pathogens

1.3 ผักหนาม

ผักหนาม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lasia spinosa* Thw. อยู่ในวงศ์ Araceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุกที่พบในบริเวณที่ชื้น ริมหหนองน้ำ มีหนามแหลมตามต้นและก้านใบ มีเหง้าอยู่ใต้ดิน ลำต้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-5 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยวขอบใบหยักเว้าลึกออกเป็นแฉกๆ กว้างมากกว่า 25 เซนติเมตร ยาว 30-40 เซนติเมตร ก้านใบยาวประมาณ 20-50 เซนติเมตร ใบอ่อนมีวนเป็นแท่งกลมปลายแหลม ช่อดอกเป็นแท่งและมีดอกย่อยอัดกันแน่น มีกาบหุ้มช่อดอกสีน้ำตาล ก้านช่อดอกยาวมีหนาม ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผักหนาม (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 2538)

สรรพคุณทางยา เช่น

เหง้า แก้ไอ ขับเสมหะ แก้คัน และถอนพิษ

รากและใบ ขับเสมหะ

ก้านและใบ ตำรวมกับเกลือ ช่วยเจริญอาหารในสัตว์ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 2538)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า ในผักหนามมีสารพิษชื่อ cyanogenic glycoside เมื่อถูกย่อยจะได้สาร hydrocyanic acid หรือ prussic acid (HCN) ซึ่งจะเป็นพิษต่อระบบเลือด ทำให้เซลล์ต่างๆ ของร่างกายขาดออกซิเจน กล้ามเนื้อทำงานไม่ประสานกัน หายใจลำบาก กล้ามเนื้ออ่อนแรง มีนงง ชัก และอาจถึงกับหมดสติ แต่สารนี้จะสลายตัวได้ง่ายถ้าถูกความร้อน ดังนั้นก่อนนำมารับประทานจึงต้องผ่านกรรมวิธีที่ใช้ความร้อนเสียก่อน

ผักหนามจัดเป็นพืชผักพื้นบ้านที่มีการนำมาประกอบอาหารและใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้ เนื่องจากคุณสมบัติประโยชน์มากมายของผักหนาม ทำให้ในปัจจุบันได้มีการรายงานการวิจัยเกี่ยวกับผักหนามเพิ่มขึ้น ดังนี้

Tran และคณะ (2003) ได้สกัดสารจากพืชสมุนไพรในเวียดนาม 14 ชนิดโดยใช้ methanol, methanol-water (1:1) และ water เป็นตัวทำละลาย แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย (Antimalarial activity) ด้วยการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อ *Plasmodium falciparum* strain FCR-3 (ATCC 30932) และ mouse mammary tumor FM3A cell line (Wild-type, subclone F28-7) พบว่า สารสกัดจากผักหนามมีฤทธิ์ต่อต้าน *P. falciparum* และ FM3A ได้ดีในระดับหนึ่ง ($EC_{50} < 10$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ

Thi Hong Van และคณะ (2006) ได้ทำการวิเคราะห์หาสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ในผักหนามโดยใช้ spectroscopic และ spectrometric methods ร่วมด้วย NMR และ ESI-MS-MS techniques พบว่า ประกอบด้วยสารต่างๆ 9 ชนิด คือ Lyoniresinol, *p*-hydroxy benzoic acid, 4-methoxyphenethyl alcohol, *p*-hydroxy benzaldehyde, isovanillic acid, vitexin 2''-*o*- β -D-glucopyranoside, 3'-methyl quercetin-3-*o*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) β -D-glucopyranoside และ vitexin and meridinol โดย vitexin และ vitexin 2''-*o*- β -D-glucopyranoside จัดเป็น flavone C-glycosides ส่วน 3'-methyl quercetin-3-*o*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside จัดเป็น flavonol ซึ่งชนพื้นเมืองในประเทศเวียดนามใช้ผักหนามในการต่อต้านการอักเสบและโรคหัวใจอักเสบ

Maisuthisakul และคณะ (2007) ได้หา phenolic content และ free radical-scavenging capacity ของสมุนไพรไทย 26 ชนิด หนึ่งในนั้นคือ ตา (bud) ของผักหนามที่หลังจากการสกัดด้วย 95% ethanol จะให้ค่า total phenolics เท่ากับ 6.4 ± 0.1 มิลลิกรัม GAE (Gallic acid equivalent)/กรัมของน้ำหนักแห้ง ให้ค่า total flavonoids เท่ากับ 4.4 ± 0.1 มิลลิกรัม RE (rutin equivalents)/กรัมของน้ำหนักแห้ง และให้ค่า DPPH radical-scavenging activity (EC_{50}) เท่ากับ 7.49 ± 0.02 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร DPPH ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระเล็กน้อยเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ

Maisuthisakul และคณะ (2008) ได้ศึกษา antioxidant properties และองค์ประกอบทางเคมีของผักหนามและสมุนไพรไทยอีก 27 ชนิด พบว่า ใบผักหนามที่สกัดด้วย 95% ethanol มี antiradical activity ($1/EC_{50}$) เท่ากับ 0.1 มี total phenolics เท่ากับ 6.4 มิลลิกรัม GAE/กรัมของน้ำหนักแห้ง มี total flavonoids เท่ากับ 4.4 มิลลิกรัม RE/กรัมของน้ำหนักแห้ง และประกอบไปด้วย โปรตีน 17.9 กรัม ไขมัน 3.8 กรัม คาร์โบไฮเดรต 45.5 กรัม ให้พลังงาน 288.5 กิโลแคลอรี ไฟเบอร์ 15.4 กรัม แคลเซียม 250.0 มิลลิกรัม เหล็ก 19.2 มิลลิกรัม และวิตามินซี 455.1 มิลลิกรัม โดยส่วนประกอบต่างๆ เหล่านี้จะเทียบกับน้ำหนักแห้งของพืชวัตถุดิบ 100 กรัม

1.4 จี๋หนอน

จี๋หนอน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Uraria crinita* (L.) Desv. ex D.C. อยู่ในวงศ์ Papilionoideae หรือ Leguminosae ชื่อสามัญคือ หางหมาจอก ชื่ออื่น ๆ ได้แก่ หญ้าตะขาบ หญ้าหางแมว หางกระรอก หญ้าหางเสือ ดอกหางเก้ง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรงสูง 30-120 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตร ใบประกอบแบบขนนก ใบย่อย 5-7 ใบ ใบรูปขอบขนานแกมรูปไข่ กว้าง 4.0-7.6 เซนติเมตร ยาว 8-13 เซนติเมตร เนื้อใบหยาบ ขอบใบเรียบ หน้าใบไม่มีขน หลังใบมีขนสั้นมาก เมื่อจับจะรู้สึกสาก ก้านใบสีเขียวแกมแดง ดอกมีสีม่วงแดง ออกเป็นช่อตั้งที่ปลายยอด รูปทรงกระบอกยาว โคนใหญ่ปลายเรียว กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 15-40 เซนติเมตร ดอกย่อยเรียงอัดตัวกันแน่นคล้ายดอกถั่ว ขนาดเล็ก มีกลีบดอกตั้ง ขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 1-2 เซนติเมตร ก้านดอกย่อยมีขนคาย ผลเป็นฝักแบน ขดบิดอยู่ชิดกัน สีเขียวอ่อน เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ กว้าง 3 มิลลิเมตร ยาว 1 เซนติเมตร ดังภาพที่ 4 (องค์การสวนพฤกษศาสตร์ 2538)



ภาพที่ 4 จี๋หนอน (องค์การสวนพฤกษศาสตร์ 2538)

ภูมิปัญญาอีสานใช้ใบจี๋หนอนปกคลุมไผ่ปลาร้าเพื่อป้องกันหนอนขึ้นปลาร้า นอกจากนี้เปลือกของต้นทั้งสดและแห้งเมื่อนำมาแช่ในน้ำหรือต้กับน้ำ จะเกิดฟองขาวใช้ทำความสะอาดแทนสบู่ หรือใช้พอกสุ่มศีรษะเด็กแก้หวัด คัดจุมูก และปรุงเป็นยาเขียวสำหรับแก้ไข้ได้

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพืชในวงศ์ papilionoideae มากมายโดยเฉพาะหางกระรอก (*Uraria picta*) แต่แทบจะไม่มีรายงานเกี่ยวกับต้นจี่หนอนเลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นสมุนไพรที่ไม่ค่อยเป็นที่รู้จักมากนัก รายงานการวิจัยเกี่ยวกับจี่หนอน ได้แก่

Yen และคณะ (2001) ได้ทำการสกัดรากจี่หนอนด้วย methanol เพื่อศึกษาถึง antioxidant activity และ nitric oxide-scavenging effect พบว่า สามารถยับยั้งการเกิด DNA damage ใน macrophage ที่ชักนำโดย sodium nitroprusside (25–200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังสามารถลดการเกิด nitric oxide ของ lipopolysaccharide ใน RAW 264.7 ซึ่ง nitric oxide-scavenging effect สัมพันธ์กับ antioxidant activity (Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay) และเมื่อนำสารสกัดไปแยกวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยวิธี UV-VIS spectrophotometry, IR, MS และ NMR พบสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ genistein

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับพืชอื่นๆ ในวงศ์ Papilionoideae

Rahman และคณะ (2007) ได้สกัด isoflavanones จากหางกระรอก (*Uraria picta*) ด้วย petroleum ether CHCl_3 และ methanol เพื่อหา antimicrobial activity พบว่า สารสกัดมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5–200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในการต่อต้านแบคทีเรีย ได้แก่ gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* NCTC10788 และ *Bacillus subtilis* NCTC8236) gram-negative bacteria (*E. coli* NCTC9001 และ *Proteus vulgaris* NCTC4175) และเชื้อรา (*Aspergillus niger* NCPF3149 และ *Candida albicans* IMI149007) นอกจากนี้ยังได้แยกองค์ประกอบของรากหางกระรอกด้วยเทคนิคด้าน UV, IR, MS และ NMR พบสารในกลุ่ม triterpene และ isoflavanones โดย 12-ole-anene-3 β ,22 β -diol เป็นสารในกลุ่ม triterpene ส่วน 5,7-dihydroxy-2'-methoxy-3',4'-methylenedioxyisoflavanone, 5,7,4'-trihydroxy-2',3'-dimethoxyisoflavanone (parvisoflavanone), 4',5,-dihydroxy-2'0,3'-dimethoxy-7- (5-hydroxyoxochromen-7yl)-isoflavanone, 4',5,7-trihydroxy-2'-methoxyisoflavanone (isoferreirin), 2',4',5,7-tetrahydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl) isoflavanone และ 2',4',5,7-tetrahydroxyisoflavanone เป็นสารในกลุ่ม isoflavanones

จะเห็นได้ว่านอกจากเปลือกต้นเพกาแล้ว ส่วนรากของพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กระดิน ผักหนาม และจี่หนอนยังมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย และการป้องกันมะเร็งอยู่น้อย โดยเฉพาะจี่หนอนเป็นสมุนไพรที่ยังไม่ค่อยรู้จักกันมากนัก ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านี้ ได้แก่ เปลือกต้นเพกา รากต้นกระดิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอน โดยการหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย และการยับยั้งเซลล์มะเร็งเพื่อ

เป็นการหาข้อมูลเพิ่มเติมจากที่เคยมีรายงานไว้ รวมทั้งนำเสนอแหล่งสมุนไพรใหม่ๆ และอาจเป็นทางเลือกในการนำพืชเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2. อนุมูลอิสระ (Free radicals)

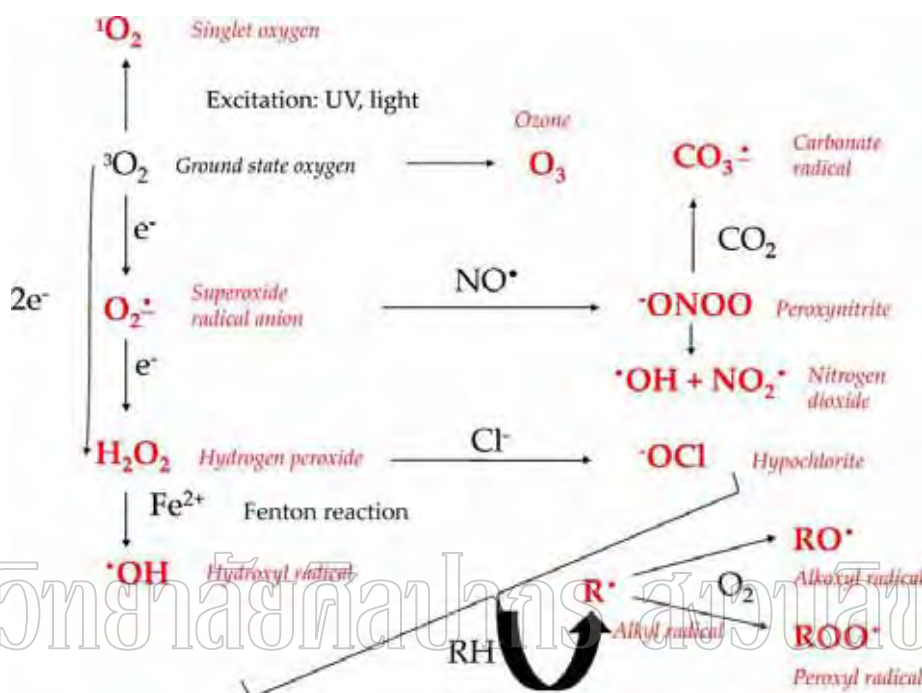
อนุมูลอิสระ คือ สารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยววิ่งอยู่รอบนอกโมเลกุลหรืออะตอม จัดเป็นสารที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา โดยจะไปแย่งจับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น ทำให้โมเลกุลนั้นๆ ไม่เสถียรและเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป ซึ่งส่วนใหญ่เรามักให้ความสนใจกับสารที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง เรียกรวมๆ ว่า reactive oxygen species (ROS) เนื่องจากออกซิเจนมีอิเล็กตรอนเดี่ยวที่วงนอกถึง 2 ตัว ดังนั้น ออกซิเจนจึงเป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไวและอันตรายมาก

อนุมูลอิสระ เกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ ทั้งจากการรับประทานอาหารที่ไม่ถูกต้อง เช่น รับประทานอาหารที่มีไขมัน หรือรสจัดมากเกินไป รับประทานอาหารจำพวกของปิ้งย่าง ทอดเป็นประจำ เป็นต้น อาจเกิดจากความเครียด หรือการพักผ่อนไม่เพียงพอ เกิดจากรังสียูวีและรังสีอื่นๆ หรือเกิดจากสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น สารเคมี ยาฆ่าแมลงที่ปนเปื้อนกับอาหารที่บริโภค คิววัน บุหรี่ คิววันจากท่อไอเสีย คิววันจากโรงงานอุตสาหกรรม และสารพิษอื่นๆ นอกจากนี้ยังเกิดจากการออกกำลังกายที่มากเกินไปจนเกิดกระบวนการเผาผลาญที่ไม่ใช้ออกซิเจน หรือเกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะประชากรในเมืองใหญ่ๆ ที่มีมลภาวะจะมีความเสี่ยงต่อการสะสมอนุมูลอิสระในปริมาณสูง

เมื่ออะตอมของออกซิเจนถูกกระตุ้นด้วยแสง รังสี หรือปัจจัยต่างๆ ก็จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ singlet oxygen หรือ ozone หรือหากได้รับอิเล็กตรอนเดี่ยวก็จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ superoxide radical แต่หากได้รับอิเล็กตรอน 2 ตัว ก็จะอยู่ในรูปของ hydrogen peroxide และเมื่อ hydrogen peroxide จับตัวกับไอออนของทองแดงหรือเหล็ก ก็จะเปลี่ยนสภาพเป็น hydroxyl radical ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อ hydrogen peroxide จับกับ superoxide radical ก็จะกลายเป็น singlet oxygen นอกจากนี้ อนุมูลอิสระเหล่านี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลหรือสารอื่นๆ เกิดเป็นอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 5 ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น singlet oxygen (1O_2), superoxide radical anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (HO^\cdot), ozone (O_3), peroxy radical (ROO^\cdot) และ hydrogen radical (H^\cdot) เป็นต้น (Bartosz 2009)

อนุมูลอิสระ เป็นสารที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาจึงสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่ใกล้ๆ ก่อให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ (DNA) เป็นผลให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา เช่น ทำให้อวัยวะต่างๆ เสื่อมเร็วกว่าปกติ หรือแก่เร็ว โดยไปทำให้เกิดความผิดปกติที่ DNA เกิด

โรคมะเร็ง เส้นเลือดตีบตัน กล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน ไตวาย เกิดอัมพาตครึ่งซีก เกิดโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน เช่น โรคข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น การเกิดการอักเสบของกล้ามเนื้อ เอ็น และข้อ โดยเฉพาะการเป็นตะคริว โรคความจำเสื่อม โรคสมองเสื่อม parkinson เป็นต้น



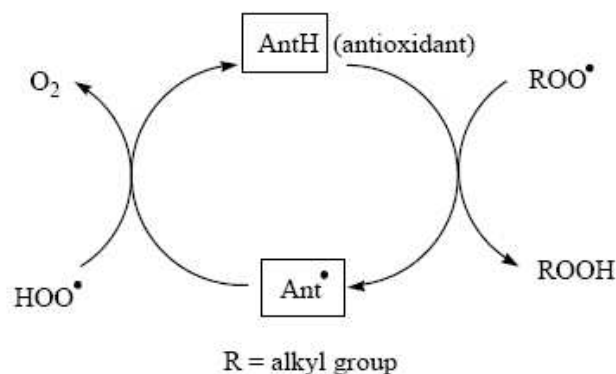
ภาพที่ 5 วงจรการเกิด ROS (Reactive Oxygen Species) ชนิดต่างๆ (Bartosz 2009)

3. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

โดยปกติอนุมูลอิสระเกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ ในร่างกายอยู่แล้ว และร่างกายก็จะมีระบบที่กำจัดอนุมูลอิสระออกไป เรียกว่า ระบบแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidant) แต่เนื่องจากเราได้รับสารพิษมากขึ้นในปัจจุบันทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายผลิตได้นั้นไม่เพียงพอ ดังนั้นเราจึงมีความจำเป็นต้องบริโภคอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ด้วย เช่น ผัก และผลไม้บางชนิด เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

1. ชนิดที่เป็นเอนไซม์ ซึ่งร่างกายสามารถผลิตขึ้นได้เอง เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (Superoxide dismutase, SOD) คาตาเลส (Catalase, CAT) กลูตาไธโอน เปอร็อกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPX) และ กลูตาไธโอนรีดักเตส (Glutathione reductase, GR) เป็นต้น
2. ชนิดที่เป็นวิตามิน ซึ่งได้รับจากภายนอกในร่างกาย เช่น วิตามินซี (V_C) วิตามินอี (V_E) กลุ่มวิตามินบี (V_B) เป็นต้น

3. ชนิดอื่นๆ ได้แก่ กลีโอะเร่และเร่ธาตุต่างๆ เช่น แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) สเตอรอยด์ (Steroids) กาลิก แอซิด (Gallic acid) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เซเลเนียม (Selenium) และแมงกานีส (Manganese) เป็นต้น



ภาพที่ 6 วงจรการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (นงนภัศ ดวงดี 2551)

สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดจะมีหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระเฉพาะตัว ไม่สามารถต้านได้ทุกตัว โดยจะเปลี่ยนสภาพของอนุมูลอิสระให้มีฤทธิ์น้อยลงตามลำดับ จนกระทั่งเหลือเป็นออกซิเจนกับน้ำ เช่น

Superoxide radical anion สามารถถูกกำจัดโดย SOD และวิตามินซี โดยจะถูกแยกเป็น Hydrogen peroxide และน้ำ จากนั้นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ตัวอื่น จะแยกสลายต่อจนได้น้ำในที่สุด

Hydrogen peroxide ถูกกำจัดโดย CAT แยกสลายเป็นออกซิเจนกับน้ำ

Lipid peroxide ถูกกำจัดโดย GPX

Hydroxyl radical ถูกกำจัดโดย GPX และ GR โดยอาศัยวิตามินอี เบต้าแคโรทีน ฟลาโวนอยด์ และอื่นๆ เป็นตัวช่วย

Singlet oxygen ถูกกำจัดโดยเอนไซม์ร่วมกับอัลฟาแคโรทีน เบต้าแคโรทีน วิตามินอี วิตามินซี วิตามินบี₂ และอื่นๆ

โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่การทำงาน 3 แบบ ดังนี้

1. ยับยั้งแหล่งที่จะเป็นต้นกำเนิดของอนุมูลอิสระ
2. ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เพื่อลดอันตรายและผลเสียที่จะเกิดขึ้น
3. ซ่อมแซมส่วนที่ได้รับความเสียหายจากอนุมูลอิสระ เพื่อทำให้บริเวณที่ถูกทำลายกลับมาเหมือนเดิม (พนิดา กุลประสูติติก 2548)

สามารถเขียนสมการแสดงการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ ดังนี้



(นงนภัส ดวงดี 2551)

4. วิธีวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

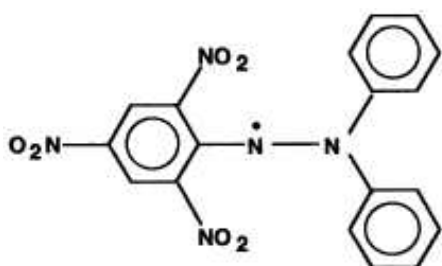
4.1 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (% Scavenging effect)

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) คือ อนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก ดังภาพที่ 7(1) เพื่อเปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 7(2) ดังนั้นความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพ

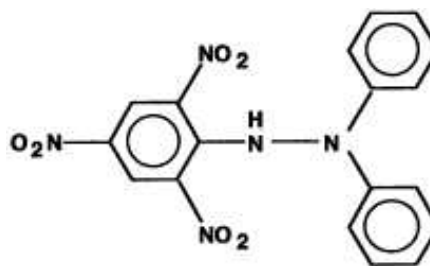
ของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในสารละลาย (ดัดแปลงมาจาก Ao และคณะ, 2008) โดยให้ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด โดยเมื่อ DPPH ถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor DPPH ที่มีสีม่วงจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ DPPH-H ที่มีสีเหลือง และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (ภาพที่ 8) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

และสามารถคำนวณหา % scavenging effect ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Scavenging effect} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

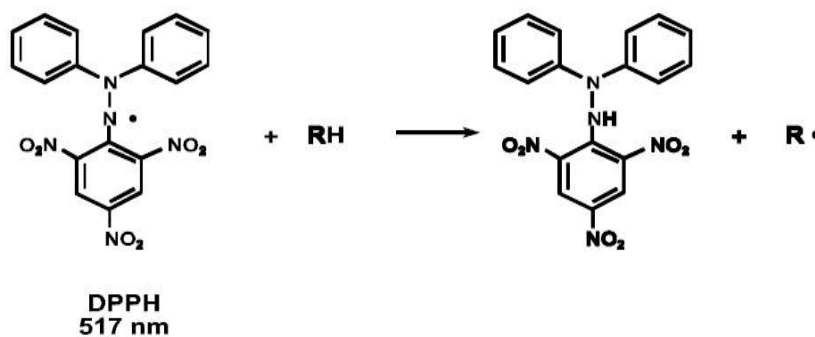
ภาพที่ 7 โครงสร้างของ DPPH ที่อยู่ในรูป free radical และ nonradical (Molyneux 2004)



มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 8 สีของสารละลาย DPPH ที่เปลี่ยนไป เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

เมื่อ DPPH จับกับสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะอยู่ในรูป reduced form (DPPH-H) แสดงในภาพที่ 9 ดังนี้



ภาพที่ 9 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH radical กับ สารต้านอนุมูลอิสระ (Prakash 2001)

4.2 การหาความเป็น Reducing power ของ สารสกัด (Antioxidant activity)

นอกจากการหา % scavenging effect แล้ว การหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระยังสามารถวิเคราะห์ได้อีกในเชิงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอน (Reducing power ability) (Benzie และ Strain 1996) โดยสารที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์สามารถให้อิเล็กตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลในตระกูลของโลหะที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ เช่น เหล็ก ทองแดง เป็นต้น และเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ได้ดี ในด้านชีวเคมี อนุมูลอิสระที่พบมากที่สุดเป็นสารที่มีออกซิเจนและไวต่อปฏิกิริยา (ROS) ไอออนอิสระของเหล็กสามารถเป็นตัวเร่งการเกิด ROS เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลไฮดรอกซิล เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ จะใช้วิธี เช่น ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชันและติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อ ferric tripyridyltriazine (Fe_3^+ -TPTZ) ให้อิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ ferrous tripyridyltriazine (Fe_2^+ -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงินที่ค่าการดูดกลืนแสง 593 nm (ภาพที่ 10) ซึ่งหากค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น แสดงว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์

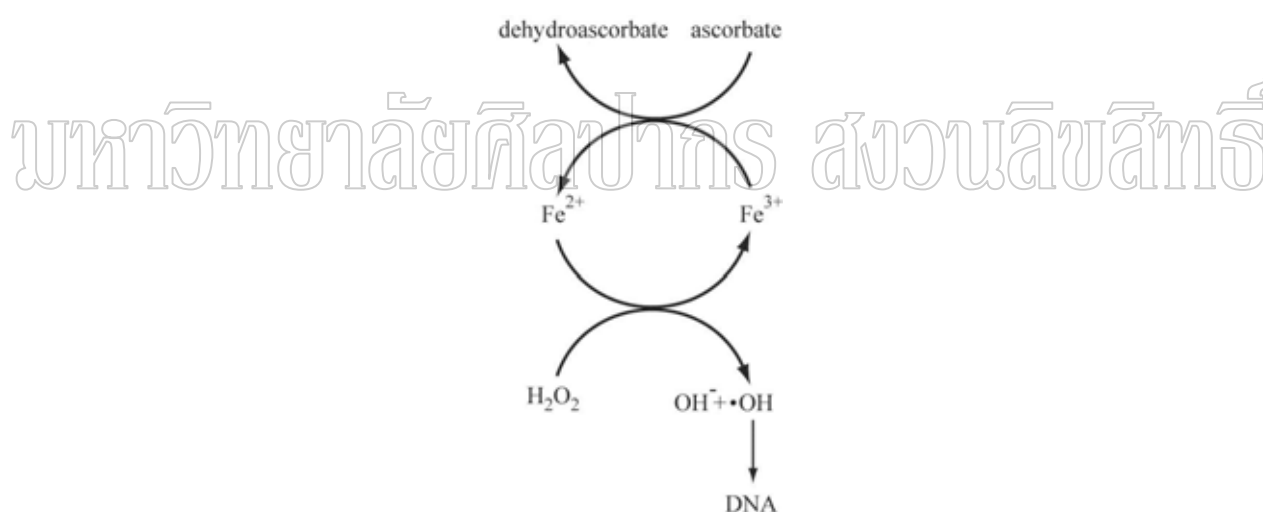
โดยอาจใช้ $FeSO_4$, trolox, ascorbic หรือ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน (Standard) ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงในรูปของไมโครกรัม standard equivalent/กรัมของสารสกัด นอกจากนี้ Fe^{3+} ยังถูก oxidize ได้ง่ายด้วยอากาศ หากเตรียมสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลานานสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองกลายเป็นน้ำเงิน ดังนั้น จึงควรเตรียมสารละลายก่อนการใช้งาน



ภาพที่ 10 สีของสารละลาย FRAP ที่เปลี่ยนไป เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

4.3 การหาประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DNA (DNA protection)

ในการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในด้านการป้องกันการเกิด oxidized ของ DNA (ดัดแปลงจากวิธีของ Ningappa และคณะ 2008) ทำได้โดยใช้ Fenton's reagent (Oxidizing agent) ซึ่งประกอบด้วย ferric chloride, ascorbate และ hydrogen peroxide (H_2O_2) สามารถทำให้ calf thymus DNA เกิดการแตกหัก (Degrade) ได้โดย ascorbate ทำปฏิกิริยากับ $FeCl_3$ ได้ Fe^{2+} จากนั้น Fe^{2+} ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้ Fe^{3+} และเกิด hydroxyl radical ซึ่ง hydroxyl radical จะไปทำลาย deoxyribose Ring ของ calf thymus DNA ที่ตำแหน่ง C_1 และ C_4 ทำให้ calf thymus DNA เกิดการแตกหัก ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งหากใส่สารสกัดลงใน calf thymus DNA ที่เติม Fenton's reagent แล้ว DNA ไม่เกิดการแตกหัก แสดงว่าสารสกัดสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ calf thymus DNA ได้



ภาพที่ 11 ปฏิกิริยาการเกิด hydroxyl radical (Flaus และคณะ 2006)

5. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) ได้แก่ สารประกอบที่มี aromatic ring อย่างน้อย 1 hydroxyl group และรวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่างๆ เป็นสารประกอบทุติยภูมิจากธรรมชาติ ที่พบในผักและผลไม้ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับสีและกลิ่นรสของพืช

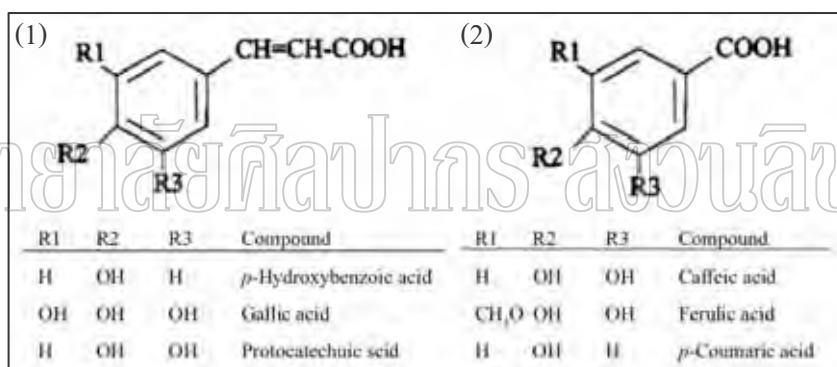
สารประกอบฟีนอลิก แบ่งได้ 3 กลุ่ม ตามโครงสร้าง ดังนี้

1. Volatile phenols เป็นสารฟีนอลอย่างง่าย ซึ่งจะพบมากในขณะที่ยังอ่อน และจะลดลงเมื่อฝักหรือผลไม้เริ่มแก่ เช่น phenol, o-cresol, 4-ethylphenol, guaiacol, 4-vinylguaiacol และ eugenol

2. Phenolic acids แบ่งเป็น 2 กลุ่มตามความแตกต่างของ hydroxylations และ methoxylations ของ aromatic rings ดังแสดงในภาพที่ 12 ได้แก่

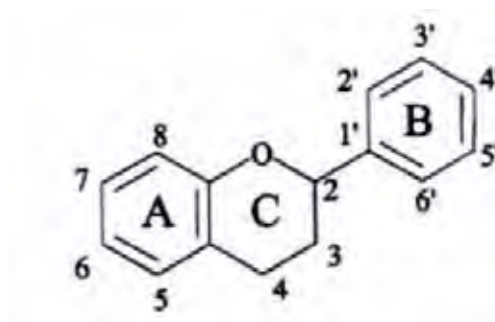
2.1 Hydroxybenzoic acids เช่น salicylic, gallic acid, p-hydroxybenzoic, tannins และ lignins

2.2 Hydroxycinnamic เช่น p-coumaric acids, caffeic, ferulic และ sinapic acids



ภาพที่ 12 โครงสร้างของ hydroxybenzoic (1) และ hydroxycinnamic acid (2) (Schuster และ Hemann 1985)

3. Flavonoids ประกอบด้วย aromatic rings 2 วง (A ring และ B ring) ที่เชื่อมผ่านคาร์บอน 3 ตัว (C ring) ดังภาพที่ 13 สารในกลุ่มนี้ เช่น anthocyanidins, chalcones, flavanols, flavanones, flavones, flavonol และ isoflavones (พิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล 2549)



ภาพที่ 13 โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoid (Pietta 2000)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในพืช ใช้วิธี Folin–Ciocalteu method (ตามวิธีของ Ao และคณะ 2008) โดยจะให้สารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ Folin - Ciocalteu reagent ซึ่งมีส่วนผสมของ phosphomolybdate - phosphotungstate ในสถานะที่เป็นต่าง โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเนื่องจาก molybdotungstate reagent และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบ คือ Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีเขียวถึงน้ำเงิน (ภาพที่ 14) ซึ่งจะติดตามได้ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การรายงานผลอาจใช้ FeSO_4 , trolox, ascorbic หรือ gallic acid เป็น standard ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงในรูปของ มิลลิกรัม standard equivalent/กรัมของสารสกัด



ภาพที่ 14 สีของสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent ที่เปลี่ยนไป เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มข้นต่างๆ

6. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

6.1 วิธีที่ใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

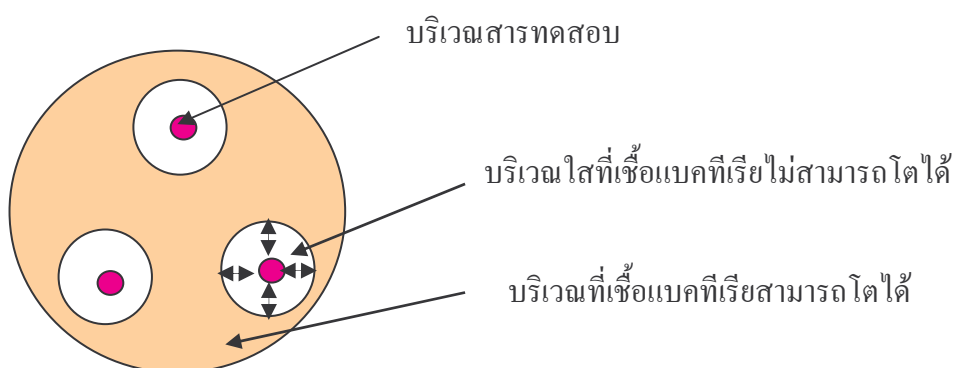
การยับยั้งแบคทีเรียสามารถหาได้หลายวิธี ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลังการบ่มกับสารทดสอบ ส่วนใหญ่ใช้วิธีการวัดบริเวณใส (Clear zone) รอบๆ สารทดสอบซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้

วิธีที่นิยมในการหาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่

1. Agar spot assay คือ การหยดสารทดสอบลงบนอาหารแข็งโดยตรง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งที่มีเชื้อแบคทีเรีย บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิม 18-24 ชั่วโมง แล้ววัดผลการยับยั้ง โดยดูการเกิด clear zone รอบสารทดสอบ

2. Agar well diffusion assay คือ การหยดสารทดสอบลงในหลุมของอาหารแข็งที่มีเชื้อและเจาะหลุมไว้แล้วด้วย cock borer จากนั้น ไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิด clear zone รอบหลุมที่มีสารทดสอบ

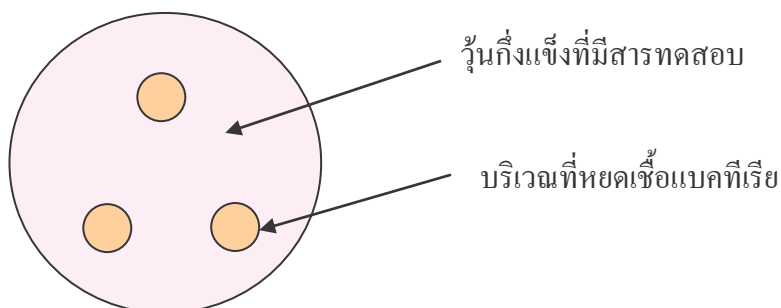
3. Paper discs method คือ การหยดสารทดสอบลงบน paper discs ทิ้งไว้ให้แห้งเพื่อระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นนำไปวางบนอาหารแข็งที่มีเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเกิด clear zone รอบหลุมที่มีสารทดสอบ ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี paper discs method

นอกจากนี้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบ จนถึงค่าหนึ่ง จะสามารถหาค่า MIC ของสารทดสอบได้ โดยค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของ

สารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 100 % ทำได้โดย หยดเชื้อลงบนอาหารกึ่งแข็งที่มีสารทดสอบ ดังภาพที่ 16 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 48 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดผล



ภาพที่ 16 ตำแหน่งที่หยดเชื้อแบคทีเรียลงบนวุ้นกึ่งแข็งที่ผสมสารทดสอบ

6.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

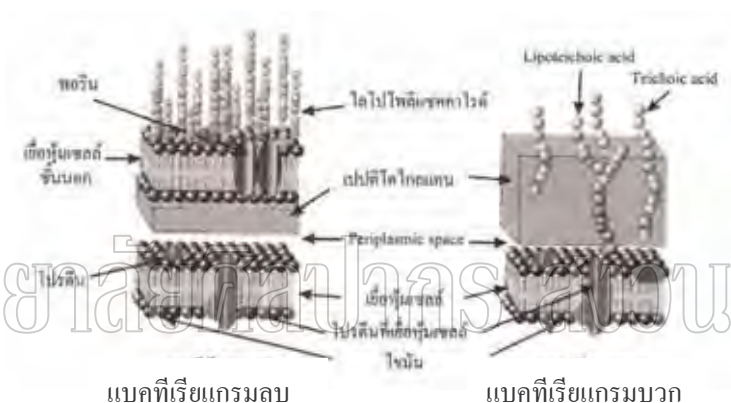
แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปและหาได้ง่าย โดยสุ่มตัวอย่างของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ได้แก่ *Salmonella enteritica* serovar Enteritidis, *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium และ *Escherichia coli*

แบคทีเรียสามารถจำแนกได้ 2 ชนิด ตามความแตกต่างของผนังเซลล์ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (ภาพที่ 17) โดยทั้ง 2 ชนิดนี้มีโครงสร้างแข็งแรงขนาดใหญ่ เรียกว่า เปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งประกอบด้วยไกลแคนสานเป็นร่างแหกับเปปไทด์สายสั้น ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นเปปติโดไกลแคนและโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบกลับมีความซับซ้อนมากกว่า เนื่องมาจากการมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดถึง 2 ชั้น โดยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น endotoxin มีส่วนสำคัญต่อการก่อโรคและความเป็นพิษของแบคทีเรียแกรมลบ

ตารางที่ 1 องค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

ส่วนประกอบ	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
เปปติโดไกลแคน	60-100 %	5-20 %
โพลีแซคคาไรด์	35-60 %	15-20%
ความหนา	15-80 นาโนเมตร	10 นาโนเมตร
เยื่อหุ้มเซลล์	1 ชั้น	2 ชั้น
ฟอสโฟลิปิด	0.2 %	10-20 %
กรดทีโคอิก*	บางชนิดมี	ไม่มี

* กรดทีโคอิก เป็น โพลีเมอร์ที่ละลายน้ำได้ มีประจุลบ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีประจุลบ (วีรานูช หลาง 2551)



ภาพที่ 17 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (วีรานูช หลาง 2551)

6.2.1 *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม โดยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายรวงงุ่น พบได้ทั่วไปในอากาศ บนผิวหนังและเยื่อเมือกของร่างกายของสัตว์เลือดอุ่นรวมถึงคนด้วย เช่น บริเวณใบหน้า ไบหู ช่องจมูก และมือ เป็นต้น ต้องการอากาศในการเติบโต (Aerobic) และไม่สร้างสปอร์ เป็นกลุ่มที่ใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการสร้างพลังงานก็ได้ (Facultative anaerobe)

S. aureus สามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหารที่มีน้ำน้อย มีความเค็มสูง โปรตีนสูง หรืออาหารที่มีไขมันสูง เช่น เนื้อสัตว์สุก แสม เนื้อ สัตว์ปีก อาหารทะเล ขนมปังอบไส้ครีม เนยแข็ง นมผง และอาหารที่เหลือจากการบริโภค เป็นต้น

โดยในระหว่างการเพิ่มจำนวนนี้ *S. aureus* จะหลั่งน้ำย่อยเพื่อย่อยโมเลกุลอาหารให้เล็กลง และน้ำย่อยนี้เป็นพิษ (Enterotoxin) และเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

นอกจากนี้ *S. aureus* ยังมักเพิ่มจำนวนในบาดแผลที่เกิดขึ้นที่ผิวหนัง เป็นสาเหตุของการเกิดฝีหนองนั่นเอง ลักษณะอาการของผู้ติดเชื้อ ส่วนใหญ่จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน พบร่วมกับอาการปวดท้องและท้องเสีย วิธีการป้องกัน คือ เก็บอาหารในที่เย็น หรือรับประทานที่ร้อนอยู่เสมอ หลีกเลี่ยงการปรุงหรือรับประทานอาหารด้วยมือเปล่า (ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ 2549)

6.2.2 *Bacillus cereus*

จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อน สามารถสร้างสปอร์และเคลื่อนไหวได้ เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe) ดำรงชีพในดิน จึงมักเกี่ยวข้องกับอาหารประเภทธัญพืชและผัก และเจริญเติบโตดีในอาหารจำพวกแป้งและโปรตีน และในอุณหภูมิของร่างกายมนุษย์

สามารถแบ่ง *B. cereus* ออกเป็น 2 กลุ่มตามการก่อโรค ได้แก่ กลุ่มที่สร้าง enterotoxin ชนิดที่ไม่ทนความร้อน ซึ่งทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการปวดท้อง ถ่ายเหลว และกลุ่มที่สร้าง emetic toxin ซึ่งทนความร้อน ทำให้ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนชัดเจนกว่าอาการทางระบบลำไส้

ส่วนใหญ่มักพบ *B. cereus* ในน้ำมันและข้าวสวย ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ดังนั้น วิธีการป้องกัน คือ การอุ่นอาหารซ้ำ หรือรับประทานของที่ปรุงสุกใหม่ๆ ซึ่งสามารถทำลาย enterotoxin ได้ แต่ไม่ทำลาย emetic toxin (ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ 2549)

6.2.3 *Bacillus subtilis*

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ใน family *Bacillaceae* ผลทดสอบ catalase เป็นบวก มี flagella แบบ peritrichous สามารถสร้าง capsule ได้ อยู่ในกลุ่ม obligate aerobe (ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต) เมื่อมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น ขาดอาหาร หรือขาดน้ำ แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถสร้าง endospore ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อความร้อน กรด และเกลือได้เป็นระยะเวลานาน และจะงอกออกมาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ได้เมื่อมีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญอีกครั้ง

แหล่งที่อยู่อาศัยพบได้ทั่วไปในดิน โดยปกติไม่จัดว่าเป็นเชื้อก่อโรคในคน แต่อาจก่อโรคได้ในโอกาสที่ยากยิ่ง โดยการปนเปื้อนไปกับอาหารแล้วทำให้เกิดอาหารเป็นพิษขึ้น และอาจทำให้แป้งขนมปังเน่าเสียได้ สามารถใช้ในการหมักอาหารได้ เช่น ถั่วเน่า เป็นต้น (Earl และคณะ 2008)

6.2.4 *Salmonella spp.*

ซัลโมเนลลา (*Salmonella spp.*) จัดอยู่ใน family *Enterobacteriaceae* มีรูปร่างลักษณะเป็นแท่ง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่สร้างสปอร์ได้ ยกเว้น *S. gallinarum* และ *S. pullorum* ที่

ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ ส่วนมากเคลื่อนไหวได้ สามารถเจริญเติบโตได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe)

อันตรายของ *Salmonella* มาจากความสามารถในการรุกรานเซลล์ของร่างกาย หลังจากการเพิ่มจำนวนในลำไส้แล้ว *Salmonella* จะรุกรานในระบบน้ำเหลืองและอาจเข้าสู่บางอวัยวะได้ โรคที่เกิดจาก *Salmonella* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

6.2.4.1 Intestinal salmonellosis เป็นโรคที่คนได้รับจุลินทรีย์ผ่านทางอาหารที่ได้จากสัตว์ ทำให้เกิดอาการท้องเสียไม่มีเลือดปน ปวดท้อง ปวดศีรษะ อาเจียน หนาวสั่นและมีไข้ เช่น *S. enteritidis* และ *S. typhimurium* เป็นต้น ซึ่งสามารถรุกรานเซลล์และกระแสเลือด ไปยังอวัยวะต่างๆในร่างกายของคนหรือสัตว์ที่ด้อยภูมิคุ้มกัน เช่น สมอ กระจุก ทางเดินหายใจ และทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น อาหารที่มักพบการปนเปื้อน เช่น เนื้อสัตว์ นมดิบ ไข่ และธัญพืช เป็นต้น

6.2.4.2 Enteric fever (Typhoid และ paratyphoid fever) เกิดจาก *Salmonella* ชนิดที่ก่อโรคในคนเท่านั้น อาการติดเชื้อที่แสดงออกไม่ชัดเจน แต่ที่สังเกตได้คือ มีไข้สูงและนานต่อเนื่อง ถ่ายเหลวอาจจะมีเลือดปนมาก็ได้ บางรายอาจท้องผูก ปวดท้อง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน และเบื่ออาหาร เป็นต้น *S. typhi* และ *S. paratyphi* สามารถรุกรานลำไส้ไปทำอันตรายต่อผู้ป่วยมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 10-30 ถ้าไม่มีการใช้ยาต้านจุลชีพ นอกจากนี้คนที่เคยติดเชื้อ *Salmonella spp.* จะเป็นพาหะของจุลินทรีย์ในระยะยาว อาจเกิดโรคเรื้อรังตามมา เช่น อาการปวดข้อ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถของ *Salmonella spp.* ในการรุกรานเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้อาจติดเชื้อทั้งระบบ หรือทั่วร่างกาย หรือในกระดูของคนหรือสัตว์ที่ด้อยภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าอาหารเกือบทุกชนิดที่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดนี้ ที่พบบ่อย ได้แก่ หอย นมดิบ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ผักประเภทกระเฉดและน้ำ (ศุภชัย เนื่อนวสุวรรณ 2549)

6.2.5 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่ง (Rod) ใน family *Enterobacteriaceae* สามารถพบได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นแทบทุกชนิด

โดยปกติจะไม่ก่อโรค แต่ *E. coli* บางกลุ่มอาจก่อโรคได้ โดยสามารถแบ่ง *E. coli* ได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

6.2.5.1 Normal *E. coli* เป็นกลุ่มที่พบในทางเดินอาหารของคนและสัตว์เกือบทุกชนิด โดยปกติจะไม่เป็นอันตราย แต่อาจก่อโรคได้ เช่น ถ้าร่างกายได้รับ *E. coli* มากเกินไป หรือกรณีได้รับ *E. coli* ที่ไม่คุ้นเคย เช่น จากพื้นที่อื่น หรือทารกได้รับเป็นครั้งแรก

6.2.5.2 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นชนิดที่ก่อโรคในคนโดยเฉพาะในทารกและเด็กเล็ก โดยผลิต enterotoxin ชนิดที่ทนความร้อนและไม่ทนความร้อน ทำให้ลำไส้

สูญเสียน้ำและยังลดการดูดซึมน้ำกลับ จึงเกิดอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ เนื่องจากการอักเสบของทางเดินอาหาร ผู้ป่วยบางรายมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและมีไข้ร่วมด้วย มักพบ *E. coli* ชนิดนี้ในเขตที่มีการสุขาภิบาลไม่ได้มาตรฐานเพียงพอ และพบในอาหารประเภทสลัด หรืออาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการความร้อน และน้ำดื่ม

6.2.5.3 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นชนิดที่ก่อโรคในคน โดยเฉพาะในทารกและเด็กเล็ก มักระบาดในโรงพยาบาลหรือสถานรับเลี้ยงเด็กที่ขาดการสุขาภิบาลที่ดีเพียงพอ ผู้ป่วยจะถ่ายเหลวเป็นน้ำ และมีอาการคล้ายติดเชื้อ ETEC แต่รุนแรงกว่า ซึ่งหากเด็กร่างกายอ่อนแออาจทำให้ถึงขั้นเสียชีวิตได้

6.2.5.4 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นชนิดที่ก่อโรคในคนได้ทุกวัย ไม่สร้างสารพิษแต่สามารถบุกรุกเข้าไปในเซลล์ของร่างกายและหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ สามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในขั้นแรกผู้ป่วยจะมีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำตามด้วยอาการไข้และปวดท้อง ต่อมาเมื่อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้น จะไปทำลายเยื่อบุลำไส้ของร่างกายให้หลุดลอกพร้อมกับมีเลือดปนตามมา เกิดอาการถ่ายเหลวปนเลือด มักพบ *E. coli* ชนิดนี้ในอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการความร้อน และน้ำดื่ม

6.2.5.5 Vero-cytotoxigenic *E. coli* (VTEC) เป็นชนิดที่สามารถบุกรุกเข้าเซลล์ร่างกายได้คล้ายกับ EIEC ก่อโรครุนแรงทั้งในระบบทางเดินอาหารและไต ในระบบทางเดินอาหารทำให้เกิดอาการปวดท้อง ถ่ายเหลวมักมีเลือดปนมาก โดยไม่มีอาการไข้ร่วมด้วย และอาจมีกลุ่มอาการโลหิตจางจากการเสียเลือดทางปัสสาวะ hemolytic uremic syndrome (HUS) ตามมาหรือไม่ก็ได้ ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะไตวายถึงขั้นเสียชีวิตได้ มักพบจุลินทรีย์ชนิดนี้ในอาหารประเภทสลัด แฮมเบอร์เกอร์ นำนมดิบ เนื้อวัวย่าง ไส้กรอก น้ำแอปเปิ้ล โยเกิร์ต หรืออาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการความร้อน และน้ำดื่ม

6.2.5.6 Diffuse-Adhering *E. coli* (DAEC) และ enteroaggregative *E. coli* (EAEC) มักพบในทารกและเด็ก ทำให้เกิดอาการท้องเสีย อาเจียนเพียงเล็กน้อย บางรายที่ติดเชื้อ EAEC อาจมีไข้และถ่ายอุจจาระมีเลือดปน (ศุภชัย เนื่องवलสุวรรณ 2549)

7. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

7.1 วิธีการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์

เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์หรือกิจกรรมที่แสดงถึงความมีชีวิตของเซลล์หลังการบ่มกับสารทดสอบ จากนั้นนำค่าความมีชีวิตของเซลล์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้น

ต่างๆ ของสารที่ทดสอบ ค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ให้ผลยับยั้งความมีชีวิตลดลงเป็นครึ่งหนึ่งจากสถานะที่ไม่มีสารทดสอบ คือ IC_{50} (50% Inhibition Concentration)

MTT assay

เป็นวิธีตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์และการเจริญของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial dehydrogenase ที่สามารถเปลี่ยนสารละลาย MTT (3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-triazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองให้เป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีฟ้าและไม่ละลายน้ำ และเมื่อละลาย formazan ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น DMSO เป็นต้น จะสามารถวัดความเข้มสีที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรได้ โดยปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น เมื่อบ่มสารต้านอนุมูลอิสระกับเซลล์ หากสารต้านอนุมูลอิสระเป็นพิษกับเซลล์ก็จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง (กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ 2547)

7.2 เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

7.2.1 HeLa (Human cervical adenocarcinoma) (ATCC CCL 2)



ภาพที่ 18 HeLa cells (เปรมวดี สกุลสม 2549)

ประเภท เซลล์มะเร็ง

ลักษณะ Epithelial-like

อายุวะ ปากมดลูก

อาหาร Minimum essential medium (MEM)

ที่มา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

7.2.2 Vero (African green monkey kidney fibroblast) (ATCC CCL 81)



ภาพที่ 19 Vero cells (เปรมวดี สกุลสม 2549)

ประเภท เซลล์ปกติ

ลักษณะ Fibroblast-like

อายุวะ ไต (ลิง)

อาหาร Minimum essential medium (MEM)

ที่มา ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน ม.มหิดล

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารเคมีและอุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี

ชื่อบริษัท

- | | |
|---|--------------------------|
| 1. Acetic acid glacial 100% (CH ₃ COOH) | MERCK (Germany) |
| 2. Agarose | GIBCO BRL (Scotland) |
| 3. Calf Thymus DNA | Fluka (Switzerland) |
| 4. Citric acid | BDH (England) |
| 5. Dimethyl sulfoxide (DMSO) | SIGMA (Germany) |
| 6. 3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-
triazolium bromide (MTT) | Fluka (Switzerland) |
| 7. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) | SIGMA (Switzerland) |
| 8. Ethylene diamine tetra acetic acid, (EDTA)
(C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈) | Fluka (Switzerland) |
| 9. EDTA disodium salt dihydrate, (EDTA(Na ₂))
(C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ ·2H ₂ O) | BDH (England) |
| 10. Ethanol (C ₂ H ₅ OH) | LAB SCAN (Thailand) |
| 11. Ethidium bromide (C ₂₁ H ₂₀ B ₃ N ₃) | Fluka (Switzerland) |
| 12. Fetal bovine serum (hyclone) | Thermo scientific (UK) |
| 13. Folin–Ciocalteu reagent | Fluka (Switzerland) |
| 14. Gallic acid | Fluka (Spain) |
| 15. Hexane (C ₆ H ₁₄) | LAB SCAN (Thailand) |
| 16. Hydrogen peroxide 30% (H ₂ O ₂) | MERCK (Germany) |
| 17. Hydrochloric acid 35.4 % (HCl) | BDH (England) |
| 18. Iron (III) chloride hexahydrate (FeCl ₃ ·6H ₂ O) | Riedel-de Haën (Germany) |
| 19. L(+)-Ascorbic acid | Riedel-de Haën (Germany) |

20. Minimum essential medium (MEM)	GIBCO (Scotland)
21. Potassium chloride (KCl)	SIGMA (Germany)
22. Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	SIGMA (Germany)
23. Sodium acetate anhydrous (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Riedel-de Haën (Germany)
24. Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	SIGMA (USA)
25. Sodium carbonate anhydrous (Na ₂ CO ₃)	Fluka (Switzerland)
26. Sodium chloride (NaCl)	SIGMA (USA)
27. Sodium hydroxide (NaOH)	LAB SCAN (Thailand)
28. Sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	SIGMA (Germany)
29. Trypan blue	SIGMA (Germany)
30. Trypsin	GIBCO BRL (Scotland)
31. 2, 4, 6- Tri (2- pyridyl)- s- triazine (TPTZ)	Fluka (Germany)

2. เครื่องมือ/อุปกรณ์/วัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Aluminium foils
2. Autoclave
3. Auto pipette
4. Beaker ขนาด 100 250 600 และ 1000 มิลลิลิตร
5. Buchner funnel
6. Centrifuge tube ขนาด 1 และ 15 มิลลิลิตร
7. Chopping block และ Knife
8. Cylinder ขนาด 100 มิลลิลิตร
9. Desiccator cabinet
10. Dropper
11. Erlenmeyer flask ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
12. Evaporator
13. Filter paper (Whatman) เบอร์ 1 และ 5
14. Gel documentation
15. Gel electrophoresis system
16. Hemocytometer

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

17. Hot air oven
18. Laminar flow cabinet
19. Mortar
20. Pipette ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
21. Pipette aids
22. Rotary shaker
23. Rubber bulb
24. Spectrophotometer
25. Test tube
26. T-flask
27. Tip
28. Vacuum pump
29. Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร
30. Weighing apparatus
31. 96 well plate

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

3. พืชทดลอง

เปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอน จากอำเภอท่าโสม และอำเภอบ้านฝ่อ จังหวัดอุดรธานี

4. เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

Vero (จากศูนย์วิจัยและพัฒนาวัคซีน ม.มหิดล) และ Hela (จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ)

5. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis*

แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Salmonella enteritica* serovar Enteritidis, *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium และ *Escherichia coli*

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากพืช (ดัดแปลงจาก Maisuthisakul และคณะ 2007)

นำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอนตากแห้ง (ภาพที่ 19) มาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปบดให้ละเอียด (ภาพที่ 20) จากนั้นชั่งตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมา 20 กรัม ส่วนการสกัดสารจากการรวมตัวอย่างพืช 4 ชนิดเข้าด้วยกันจะชั่งมาอย่างละ 5 กรัม จากนั้นเติมตัวทำละลาย (Solvent) คือ เฮกเซน (Hexane) 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (Ethanol) 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงไป ในกรณีใช้น้ำร้อน (Hot water) เป็น solvent จะนำตัวอย่างพืชผสมกับน้ำปริมาตร 200 มิลลิลิตรไปต้มจนเดือดนาน 10 นาทีก่อน หลังจากคนตัวอย่างพืชกับ solvent ให้ผสมเข้ากันดีแล้วจึงนำไปเขย่าต่อบนเครื่องเขย่า (Rotary shaker) ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงกรองสารละลายที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 ที่บรรจุอยู่ในชุดกรองสุญญากาศ (Vacuum filter) เพื่อแยกกากออก นำสารละลายสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ได้ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) แล้วนำไปประเหยเอา solvent ออกด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปอบต่อในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจนได้ crude extract ในรูปผงแห้ง นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้ดูดความชื้น (Desiccator cabinet) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนกากที่เหลือนำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสให้แห้งจนน้ำหนักคงที่เพื่อนำน้ำหนักแห้ง (Dry weight) โดยในทุกขั้นตอนของการสกัดจะดำเนินการที่มีดด้วยการหุ้มขวดหรือภาชนะที่บรรจุสารสกัดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์



ภาพที่ 20 ตัวอย่างพืชตากแห้งที่ใช้สำหรับเตรียมสารสกัด



ภาพที่ 21 ตัวอย่างพืชตากแห้งบดละเอียด

2. การหาประสิทธิภาพในการต้านทานอนุมูลอิสระ

2.1 % Scavenging effect (คัดแปลงมาจาก Ao และคณะ 2008)

ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระของสารสกัดในการทดลองนี้ใช้วิธี DPPH โดยมีการดัดแปลงบางส่วน โดยละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลาย (ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผสมสารสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้งานทุกครั้ง) เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย UV-Vis spectrophotometer สำหรับชุดควบคุม (control) ผสมตัวทำละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับ DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร โดยไม่มีการเติมสารสกัด และทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ gallic acid และถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงไปจนกระทั่งเริ่มคงที่ จะสามารถหา Efficiency concentration 50 (EC_{50}) ได้ โดย EC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถจับกับ DPPH ได้ 50% (mg extract/ml DPPH) ในการทดลองจะวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 210 นาที

2.2 Ferric- reducing antioxidant power assay (Benzie และ Strain 1996)

เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม sodium acetate buffer pH 3.6 ความเข้มข้น 300 มิลลิโมล/ลิตร กับ TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล/ลิตรใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมล/ลิตร และ $FeCl_3$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล/ลิตรในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v) นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน (โดยเตรียมก่อนใช้งานทุกครั้ง) เมื่อต้องการทดสอบให้ละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ผสมสารสกัดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย FRAP 1.8 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ใช้ gallic acid เป็น

สารมาตรฐาน โดยค่าที่ได้จะแสดงในรูปของ gallic acid equivalents (GAE) ในหน่วย มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด

หมายเหตุ เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ การเป็น reducing power และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ตัวทำละลายต่างกัน เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 DNA protection assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Ningappa และคณะ 2008)

นำสารสกัดในรูปผงแห้งของพืชทั้ง 4 ชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดปริมาณ 0-100 ไมโครกรัม มาบ่มกับ calf thymus DNA 100 ไมโครกรัม จากนั้นเติม Fenton's reagent ได้แก่ ferric chloride ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ascorbate ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ H₂O₂ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ตามด้วย EDTA ความเข้มข้น 104 ไมโครโมลาร์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน (de-ionize water) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว นาน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำสารละลายนี้มาแยกเพื่อตรวจวิเคราะห์บน 1% Agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที และนำเจลไปส่องดูภายใต้เครื่อง Gel documentation ทำ control เปรียบเทียบโดยไม่มีการเติมสารสกัด เพื่อดูว่าแถบของ DNA มีความแตกต่างกันหรือไม่

3. Total phenolic compounds (Ao และคณะ 2008)

การหาสารประกอบฟีนอลิก ทำได้โดยละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลาย จากนั้นผสมสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย sodium carbonate solution (7.5%) 0.8 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เขย่าเป็นพักๆ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วย UV-Vis spectrophotometer ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน โดย total phenolic content จะแสดงในรูปของ gallic acid equivalents (GAE) ในหน่วยมิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด

4. การหาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพืช

4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ทดสอบ

เชื้อเชื้อแบคทีเรียจากหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว (NB) (วิธีเตรียมอาหารแสดงในภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 loop แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลล์เชียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเซลล์แบคทีเรียให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 (ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) ก่อนนำไปทดสอบ เพื่อให้มีปริมาณเซลล์ตั้งต้นใกล้เคียงกัน

4.2 วิธีหาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

4.2.1 Paper discs method (ดัดแปลงจากวิธีของ Mokbel และ Hashinaga 2005)

spread แบคทีเรียลงบน plate ที่มีอาหารแข็ง ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที วาง paper discs ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ลงบนอาหารแข็งที่มีเชื้อ (เตรียม paper discs ได้โดยละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด แล้วหยดลงบน paper discs ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10-15 นาที เพื่อระเหยเอาตัวทำละลายออก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ paper discs

4.2.2 MIC test (Mokbel และ Hashinaga 2005)

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากพืชที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Minimum inhibition concentration) สามารถหาได้โดย ละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด ผสมลงในอาหารกึ่งแข็งปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร แล้วเทส่วนผสมทั้งหมดลงบนอาหารแข็ง ทำการ pour plate ให้อาหารกึ่งแข็งกระจายทั่ว plate แล้วหยดแบคทีเรียลงบน plate 3 จุด จุดละ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลที่ได้

5. การหาความสามารถในการต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืช

5.1 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ HeLa และ Vero ใน MEM medium (ที่มี Serum 10 เปอร์เซ็นต์) ที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มี 5%CO₂

5.2 วิธีเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด ในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด กรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ (ในกรณีที่ใช้เอทานอลและเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นของเอทานอลไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด เนื่องจากเอทานอลเป็นพิษต่อเซลล์)

5.3 ตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Ljubuncic และคณะ 2005)

ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ ทำได้โดยใช้วิธี MTT โดยเจือจางเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5%CO₂) จากนั้นเติมสารสกัดจากพืชความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงที่สภาวะเดิมนาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงดูดสารทดสอบออก ล้างด้วยสารละลาย PBS แล้วเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะเดิมนาน 4 ชั่วโมงในที่มืด ตามด้วยสารละลาย DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรภายในเวลา 15-30 นาที เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงระหว่างเซลล์ที่มีและไม่มีสารทดสอบ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แสดงถึงควมมีชีวิตของเซลล์

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way และ two way ANOVA โดยการกำหนดระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ และวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Trial version)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. คุณลักษณะของสารสกัดจากตัวอย่างพืชชนิดต่างๆ

จากการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายสกัดหยาบ (Crude extract) 5 ชนิดจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม รากต้นขี้หนอน และตัวอย่างพืชทั้ง 4 ชนิดรวมกัน พบว่า สารละลายที่สกัดได้มีความเป็นกรดเล็กน้อยคือ มี pH อยู่ระหว่าง 5.33-6.21 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 pH ของสารละลายสกัดหยาบจากตัวอย่างพืชที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water

ชนิดของ	pH			
	crude extract	hexane	ethanol	hot water
เปลือกต้นเพกา		5.98 ± 0.11	5.52 ± 0.01	6.05 ± 0.04
รากต้นกระถิน		5.81 ± 0.23	5.33 ± 0.02	5.90 ± 0.04
รากผักหนาม		5.85 ± 0.05	5.30 ± 0.03	6.12 ± 0.16
รากต้นขี้หนอน		5.92 ± 0.07	5.53 ± 0.78	6.21 ± 0.12
การรวมตัวอย่างพืช*		5.85 ± 0.06	4.77 ± 1.03	6.19 ± 0.05

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นขี้หนอนมาผสมรวมกัน

และผลที่ได้จากการสกัดสารชี้ให้เห็นว่า ชนิดของ solvent ที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อสีและลักษณะของสารที่สกัดได้ โดยภายหลังจากการระเหยเอา solvent ออกจะได้ crude extracts ที่มีสีน้ำตาลเมื่อใช้ ethanol และ hot water เป็น solvent แต่จะได้ crude extracts สีเขียวอ่อนเมื่อสกัดด้วย hexane ดังแสดงในภาพที่ 22 และเมื่อสังเกตลักษณะของ crude extracts ที่ได้ก็พบว่า crude extracts ที่สกัดโดยใช้ ethanol กับ hexane มีลักษณะขุ่นหนืด แต่เมื่อใช้ hot water เป็น solvent จะได้สารสกัดที่แห้งดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งหากพิจารณาในเรื่องสีของสารสกัดที่ได้จะเห็นว่า ethanol กับ hot water ซึ่งเป็น solvent ที่มีขั้วใกล้เคียงกันให้สีของสารสกัดที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่สีของสารที่สกัดได้จากการใช้ hexane ซึ่งเป็น solvent ที่ไม่มีขั้วจะให้สีที่ต่างออกไป ดังนั้น ความมีขั้วที่แตกต่างกันของ solvent ที่เลือกใช้ทั้งสามน่าจะมีผลต่อชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ใน

ตัวอย่างพืชทดสอบที่จะถูกสกัดออกมา โดยชนิดของสารที่จะถูกสกัดออกมาจากพืช โดยใช้ ethanol และ hot water เป็น solvent นั้นน่าจะเป็นสารในกลุ่มที่มีขั้ว (polar) ในขณะที่ hexane จะดึงสารจำพวกที่มีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้ว (non polar) ออกมาได้มากกว่า ดังนั้น ชนิดของสารที่ถูกสกัดออกมาได้จากตัวอย่างพืชจึงน่าจะเป็นตัวกำหนดสีของสารที่จะสกัดได้ และหากพิจารณาต่อไปอีกถึงลักษณะของสารที่สกัดได้ดังแสดงในตารางที่ 3 นั้นก็จะเห็นว่า แม้ ethanol กับ hot water ซึ่งจัดเป็น solvent ในกลุ่มที่มีความมีขั้วเหมือนกัน แต่ก็ให้สารสกัดที่มีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งหากเปรียบเทียบความมีขั้วระหว่าง hot water กับ ethanol แล้วจะพบว่า hot water มีขั้วสูงกว่า ดังนั้น ชนิดของสารที่จะถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างพืชเมื่อใช้ hot water หรือ ethanol เป็น solvent นั้นน่าจะมีส่วนที่แตกต่างกัน ทำให้ได้สารสกัดที่มีลักษณะแห้งเมื่อใช้ hot water เป็นตัวสกัดและได้สารสกัดลักษณะขุ่นหนืดเมื่อใช้ ethanol เป็นตัวสกัด

ตารางที่ 3 ลักษณะของ crude extracts หลังระเหยเอา solvent ออก

ชนิดของ crude extract	ลักษณะของ crude extracts		
	hexane	ethanol	hot water
เปลือกต้นเพกา	สีเขียวแกมเหลืองอ่อน คล้ายน้ำมัน	สีน้ำตาลแกมเหลือง เหนียวเล็กน้อย	สีน้ำตาลไหม้ แห้งติดภาชนะ
รากต้นกระถิน	สีเขียวแกมเหลืองอ่อน คล้ายน้ำมัน	สีน้ำตาลแกมเหลือง เหนียวเล็กน้อย	สีน้ำตาลไหม้ แห้งติดภาชนะ
รากผักหนาม	สีเขียวแกมเหลืองอ่อน คล้ายน้ำมัน	สีน้ำตาลแกมเหลือง เหนียวเล็กน้อย	สีน้ำตาลไหม้ แห้งติดภาชนะ
รากต้นขี้หนอน	สีเขียวแกมเหลืองอ่อน คล้ายน้ำมัน	สีน้ำตาลแกมเหลือง เหนียวเล็กน้อย	สีน้ำตาลไหม้ แห้งติดภาชนะ
การรวมตัวอย่างพืช*	สีเขียวแกมเหลืองอ่อน คล้ายน้ำมัน	สีน้ำตาลแกมเหลือง เหนียวเล็กน้อย	สีน้ำตาลไหม้ แห้งติดภาชนะ

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นขี้หนอนมาผสมรวมกัน



ภาพที่ 22 สีของ crude extracts หลังระเหยเอา solvent ออก

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นขี้หนอนมาผสมรวมกัน

จากการสกัดสารออกจากตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบยังพบอีกว่า ชนิดของ solvent ที่ใช้ มีผลต่อปริมาณผลผลิต (yield) ของ crude extracts ที่ได้ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยการใช้ hot water สกัดให้ yield สูงสุด รองลงมาคือ การใช้ ethanol และ hexane เป็นตัวสกัดตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบ yield ที่ได้จากการใช้ solvent ชนิดเดียวกันพบว่า การสกัดสารจากตัวอย่างพืชด้วย hexane นั้น รากต้นกระถินจะให้ yield สูงสุด ในขณะที่รากต้นขี้หนอนจะให้ yield ต่ำที่สุด และ yield ของสารสกัดที่ได้จากเปลือกต้นเพกา รากผักหนาม และการรวมตัวอย่างพืชนั้น ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกับการใช้ ethanol เป็นตัวสกัดก็ให้ yield ของ crude

extracts ที่ไม่แตกต่างกัน สำหรับในกรณีที่ใช้ hot water ในการสกัดนั้นพบว่า ให้ yield ของ crude extracts ที่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปลือกต้นเพกาจะให้ yield สูงสุด รองลงมา คือ รากต้นกระถิน การนำตัวอย่างพืชทั้ง 4 ชนิดมารวมกัน และรากผักหนาม ส่วนรากต้นจันทน์ให้ yield ต่ำที่สุด

ตารางที่ 4 ปริมาณผลผลิต (yield) ของ crude extracts หลังระเหยเอา solvent ออก

ชนิดของ crude extract	กรัมของสารสกัดที่ได้/พืชวัตถุดิบ 20 กรัม		
	hexane ^C	ethanol ^B	hot water ^A
เปลือกต้นเพกา	0.11 ± 0.04 ^{ab}	0.23 ± 0.01 ^a	1.56 ± 0.18 ^a
รากต้นกระถิน	0.17 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.00 ^a	1.14 ± 0.20 ^b
รากผักหนาม	0.11 ± 0.04 ^{ab}	0.31 ± 0.13 ^a	1.00 ± 0.23 ^b
รากต้นจันทน์	0.10 ± 0.04 ^b	0.23 ± 0.12 ^a	0.55 ± 0.12 ^c
การรวมตัวอย่างพืช*	0.13 ± 0.03 ^{ab}	0.18 ± 0.02 ^a	1.03 ± 0.16 ^b

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์มาผสมรวมกัน ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน (A-C) และคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ความแตกต่างของ yield ที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบเมื่อใช้ solvent ที่แตกต่างกันนั้นก็น่าจะผลมาจากปัจจัยเดียวกันกับปัจจัยที่มีผลต่อสีและลักษณะของสารที่สกัดได้นั้นก็คือ ผลจากความมีขี้ที่แตกต่างกันของ solvent ที่ใช้ ซึ่งพบว่า solvent ที่มีขี้ (hot water และ ethanol) จะสามารถสกัดสารออกมาจากพืชได้มากกว่า ส่วน solvent ที่ไม่มีขี้ (hexane) จะสกัดสารออกมาจากพืชได้ในปริมาณที่น้อยกว่า ดังนั้น สารส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบนั้นน่าจะเป็นชนิดที่ละลายออกมากับตัวทำละลายที่มีขี้ และเมื่อเปรียบเทียบ yield ที่ได้จากการสกัดด้วย hot water และ ethanol แล้วจะเห็นว่า hot water ให้ yield ที่สูงกว่า ซึ่งนอกเหนือจากความมีขี้ที่ต่างกันจะทำให้ได้ yield ที่ไม่เท่ากันแล้ว ระดับของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดน่าจะมีผลต่อ yield ที่ได้ด้วย เพราะในการทดลองนี้ได้ใช้ hot water ซึ่งก็คือการใช้น้ำที่ระดับอุณหภูมิ น้ำเดือดในการสกัดสาร ในขณะที่การสกัดด้วย ethanol จะใช้ที่ระดับอุณหภูมิต่ำ โดยระดับอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นมานี้ทำให้ได้ yield ของ crude extracts ที่สูงขึ้น ซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Hu และคณะ (2009) ก็ได้แสดงให้เห็นในทำนองเดียวกันว่า ระดับของอุณหภูมิ

ที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อ yield ของสารที่จะสกัดได้ โดยการใช้ น้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สามารถสกัดเอาสารออกจากเห็ดสมุนไพรม (Inonotus obliquus) ได้สูงกว่าการสกัดด้วย ethanol ประมาณ 10 เท่า นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่ได้ชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิ เวลา และชนิดของ solvent มีผลต่อ yield ที่ได้ โดย Herrero และคณะ (2004) ได้เปรียบเทียบ yield ของสาหร่าย *Spirulina platensis* เมื่อใช้อุณหภูมิ เวลา และ solvent ในการสกัดที่แตกต่างกันคือ อุณหภูมิ 115 และ 170 องศาเซลเซียสที่เวลา 9 และ 15 นาที และใช้ hexane, light petroleum, ethanol และ water เป็น solvent พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการสกัดให้สูงขึ้นจะได้ yield เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ อุณหภูมิและเวลาในการสกัดเท่ากัน solvent ที่ให้ yield สูงที่สุดก็คือ water รองลงมาคือ ethanol, hexane และ light petroleum ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม crude extracts ที่ได้จากการสกัดด้วย solvent ทั้ง 3 ชนิดนั้นจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระหรือไม่จำเป็นต้องมีการทดสอบในขั้นต่อไป

2. ประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ

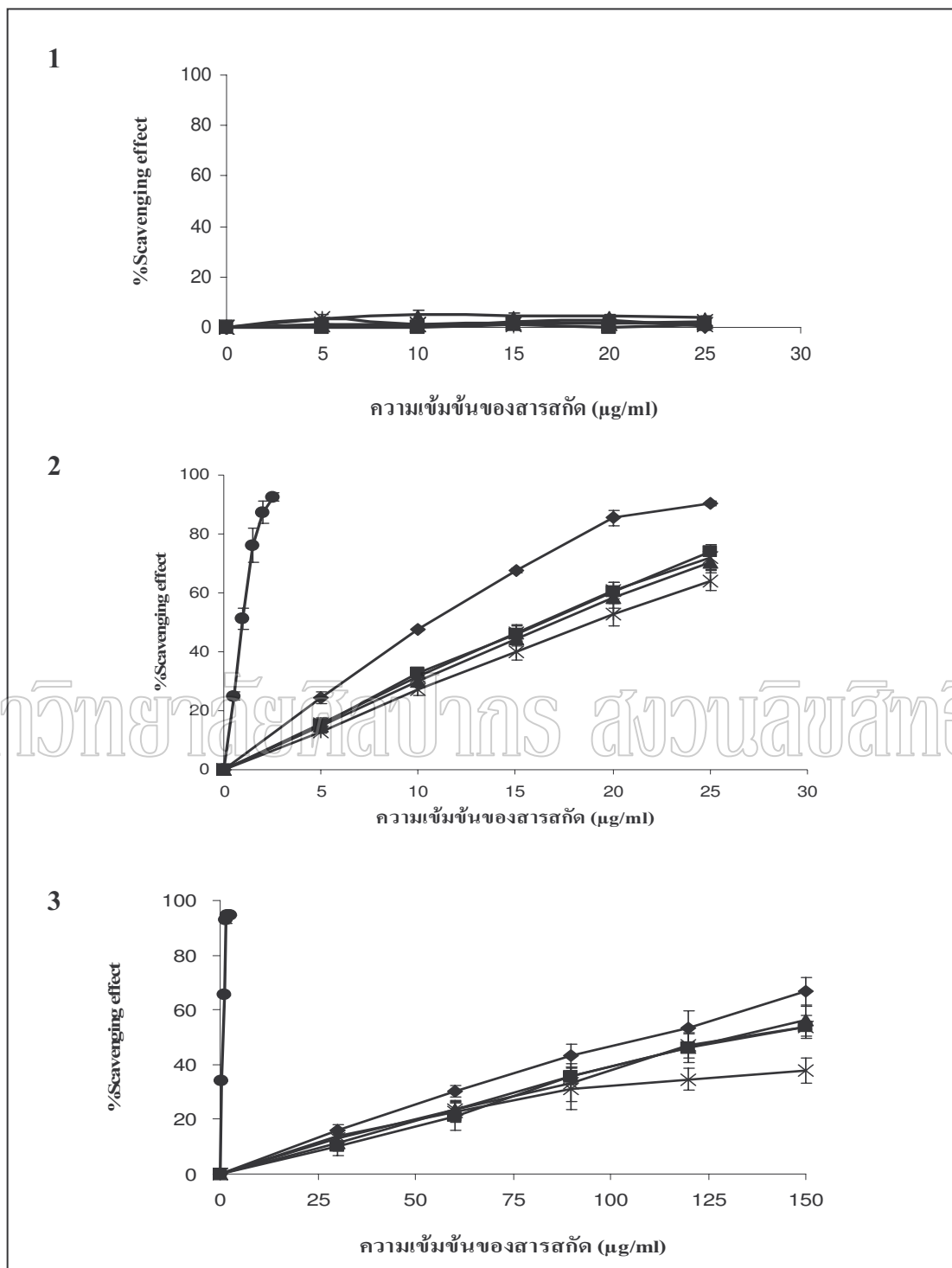
2.1 ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ

ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (Scavenging effect) ทำได้โดยใช้ DPPH assay โดยผสม crude extracts กับสารละลาย DPPH ที่มีสีม่วง แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หากพืชมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีม่วงของสารละลาย DPPH อ่อนลงจนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง จากผลการทดลองที่ได้พบว่า สารสกัดหยาบของตัวอย่างพืชทดสอบทุกชนิดที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol (Ethanol extracts) และ hot water (Aqueous extracts) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดย ethanol extracts มีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระสูงกว่า aqueous extracts อย่างไรก็ตาม สารสกัดที่ได้จากการใช้ hexane เป็น solvent นั้นแทบจะไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเลยดังแสดงในภาพที่ 2 3 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระของ ethanol extracts ที่ได้จากตัวอย่างพืชทดสอบแต่ละชนิดแล้วพบว่า ตัวอย่างพืชทดสอบมีผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระและแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งจะได้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้ใน aqueous extracts ที่สกัดด้วย hot water ในขณะที่สารสกัดจากตัวอย่างพืชทดสอบทุกชนิดที่ใช้ hexane เป็น solvent นั้นไม่แสดงความแตกต่างของประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระแต่อย่างใด และเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ ethanol extracts และ aqueous extracts จากตัวอย่างพืชทดสอบทั้ง 5 ตัวอย่างก็พบว่า ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระนั้นเพิ่มสูงขึ้นด้วย และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของประสิทธิภาพในการจับกับ

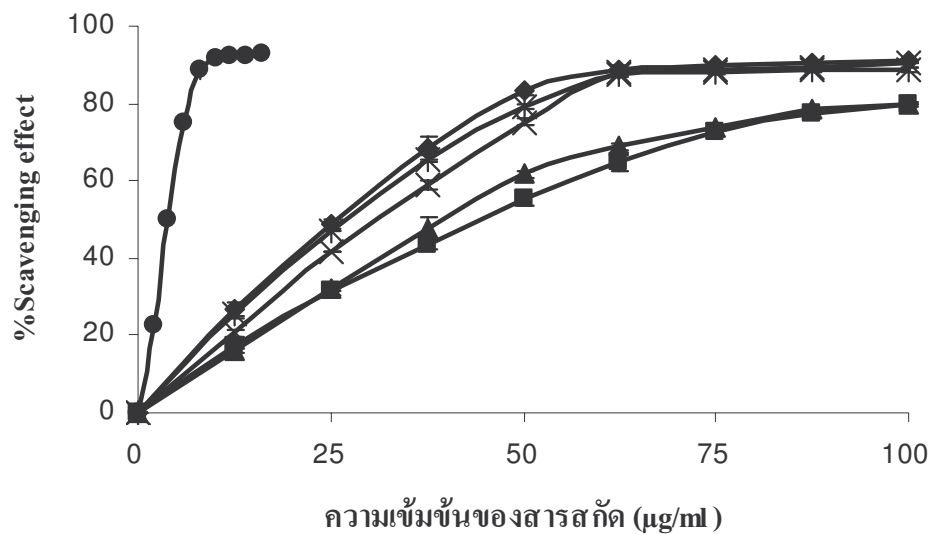
อนุมูลอิสระทางสถิติแล้วพบว่า ความเข้มข้นของ crude extracts ที่ใช้มีผลต่อประสิทธิภาพการจับกับอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ crude extracts ไปเรื่อยๆ จนถึงค่าหนึ่งประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จะเริ่มมีแนวโน้มคงที่และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดดังแสดงในภาพที่ 24 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า crude extracts มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระได้ในระดับหนึ่ง

นอกจากนี้ในการทดลองยังได้วัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 210 นาทีซึ่งค่าการดูดกลืนแสงของ crude extracts ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรจะเริ่มคงที่และสามารถหา efficiency concentration ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) ได้ โดย EC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถจับกับ DPPH เริ่มต้นได้ครึ่งหนึ่ง ซึ่งการรายงานผลจะแสดงในหน่วยของไมโครกรัม extract/มิลลิลิตรของ DPPH โดยถ้าสารทดสอบสามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ดีจะทำให้ปริมาณ DPPH เหลือน้อย และจากการทดลองพบว่า ปริมาณ DPPH ที่เหลืออยู่สอดคล้องกับความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช นั่นคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ crude extracts ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระก็จะเพิ่มขึ้นด้วย และทำให้ปริมาณ DPPH ลดลง (ภาพที่ 25) ดังนั้น สารสกัดหรือสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระได้ดีควรมีค่า EC_{50} ที่ต่ำ

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ สงวนลิขสิทธิ์



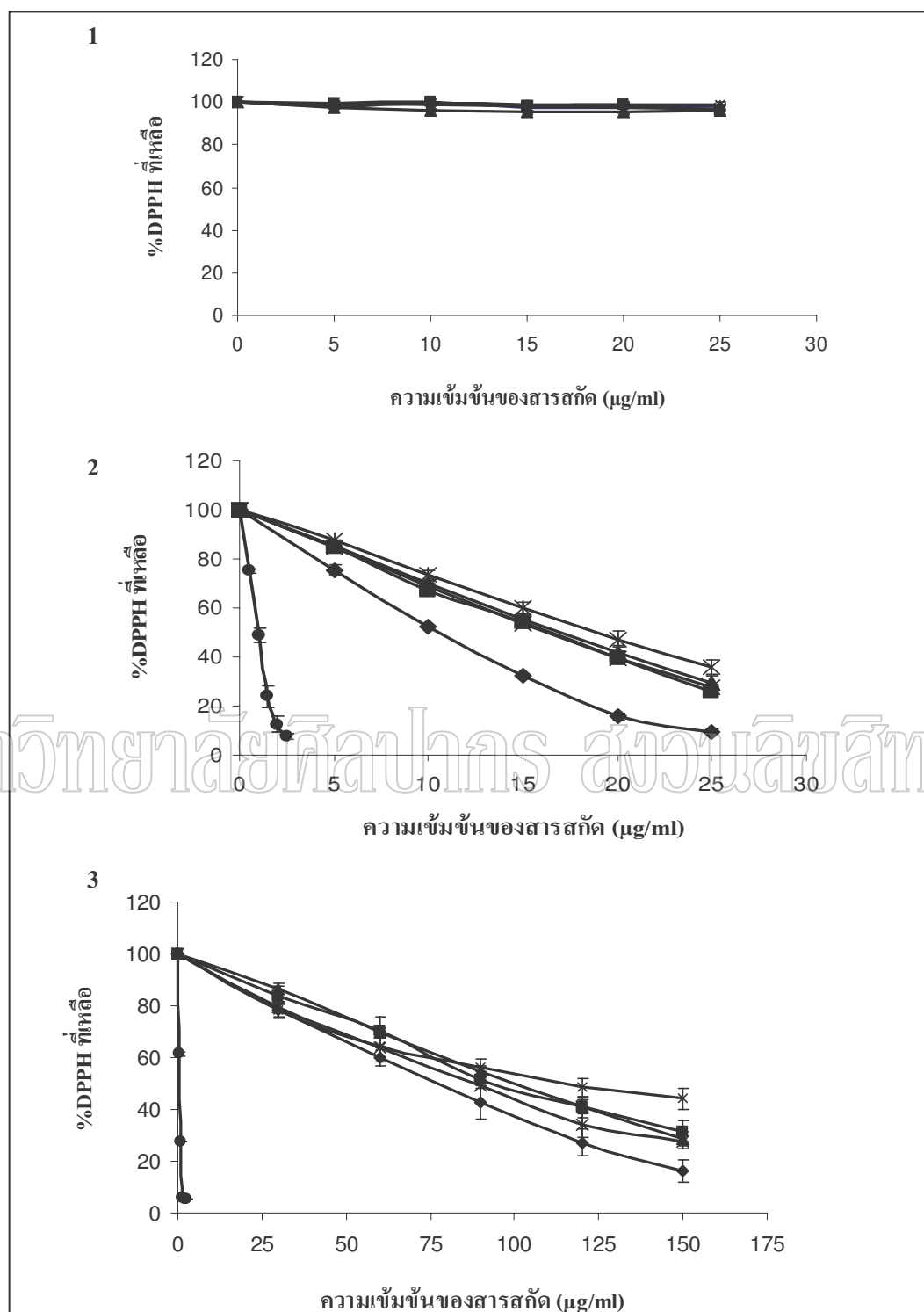
ภาพที่ 23 ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระของ crude extracts ที่ใช้ hexane (1) ethanol (2) และ hot water (3) เป็น solvent : (◆) เปลือกต้นเพกา, (■) รากกระถิน, (▲) รากผักหนาม, (×) รากขี้หนอน, (*) การรวมตัวอย่างพืช, (●) Gallic acid ; ค่าที่แสดง หมายถึง ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=9)



ภาพที่ 24 ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระของ crude extracts ที่ใช้ ethanol เป็น solvent ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ: (◆) เปลือกต้นเพกา, (■) รากกระถิน, (▲) รากผักหนาม, (×) รากจันทน์, (*) การรวมตัวอย่างพืช, (●) Gallic acid ; ค่าที่แสดง หมายถึง ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่า ชนิดของ solvent ที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อค่า EC_{50} ของสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างพืชทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดย ethanol extracts ให้ค่า EC_{50} ต่ำที่สุด ตามมาด้วย aqueous extracts ในขณะที่ crude extracts ที่ใช้ hexane เป็น solvent ไม่สามารถหาค่า EC_{50} ได้เพราะแทบจะไม่มีฤทธิ์ในการจับกับอนุมูลอิสระเลย สำหรับ crude extracts ที่ให้ค่า EC_{50} ต่ำที่สุดก็คือ ethanol extract จากเปลือกต้นเพกา มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.88 ± 0.15 ไมโครกรัม crude extracts/มิลลิลิตรของ DPPH รองลงมาคือ ethanol extracts จากรากต้นกระถิน รากต้นจันทน์ รากผักหนาม และการรวมตัวอย่างพืช อย่างไรก็ตาม เมื่อนำค่า EC_{50} ของ ethanol extracts จากทุกตัวอย่างพืชทดสอบไปเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ซึ่งก็คือ gallic acid ที่ละลายด้วย ethanol แล้วก็พบว่า ethanol extracts จากทุกตัวอย่างพืชทดสอบยังมีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระต่ำกว่ามาก ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะ gallic acid เป็นสารบริสุทธิ์ที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างเต็มที่ ในขณะที่สารสกัดจากพืชที่นำมาทดลองเป็นเพียง crude extracts ที่มีสารหลายชนิดที่ถูกสกัดออกมาผสมกันอยู่และยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสารต่างๆ ที่ผสมกันอยู่นี้อาจมีทั้งชนิดที่มีและไม่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 25 ปริมาณ DPPH ที่เหลือหลังจากทำปฏิกิริยากับ crude extracts ที่ใช้ hexane (1) ethanol (2) และ hot water (3) เป็น solvent : (◆) เปลือกต้นเพกา, (■) รากกระถิน, (▲) รากผักหนาม, (×) รากจี่หนอน, (*) การรวมตัวอย่างพืช, (●) Gallic acid ; ค่าที่แสดง หมายถึง ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=9)

ตารางที่ 5 EC₅₀ ของ crude extracts ที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water

ชนิดของ crude extract	EC ₅₀ (ไมโครกรัม crude extracts/ มิลลิลิตรของ DPPH)		
	hexane ^C	ethanol ^A	hot water ^B
เปลือกต้นเพกา	ไม่สามารถหาได้	8.88 ± 0.15 ^b	82.62 ± 6.94 ^b
รากต้นกระถิน	ไม่สามารถหาได้	16.54 ± 0.53 ^c	100.10 ± 13.88 ^{bc}
รากผักหนาม	ไม่สามารถหาได้	17.34 ± 0.98 ^c	102.92 ± 5.56 ^{bc}
รากต้นจันทน์หอม	ไม่สามารถหาได้	16.73 ± 0.98 ^c	118.12 ± 18.80 ^c
การรวมตัวอย่างพืช*	ไม่สามารถหาได้	19.19 ± 1.22 ^d	85.87 ± 15.54 ^b
Gallic acid	ไม่สามารถหาได้	0.79 ± 0.07 ^a	0.47 ± 0.00 ^a

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์หอมมาผสมรวมกัน
ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน (A-C) และคอลัมน์เดียวกัน (a-d) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมี
นัยสำคัญ (p<0.05)

2.2 ประสิทธิภาพในการเป็นตัวรีดิวซ์

ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) หรือความเป็น reducing power หาได้โดยใช้ FRAP assay โดยผสม crude extracts กับสารละลาย FRAP แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร หากสารสกัดมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ สีของสารละลายผสมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้น โดยในการทดลองใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน (Standard) ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงในรูปของมิลลิกรัม standard equivalent/กรัมของ crude extracts (มิลลิกรัม GAE /กรัม crude extracts) ซึ่งหาก crude extracts มีค่า GAE สูงแสดงว่ามีความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี

จากการหาความเป็น reducing power ของสารสกัดโดยใช้ FRAP assay พบว่าชนิดของ solvent ที่ใช้ในการสกัดสารออกจากตัวอย่างพืชทดสอบมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้จากการใช้วิธี DPPH โดย ethanol extracts มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงสุด รองลงมาคือ aqueous extracts และ hexane extracts ตามลำดับ โดยสารสกัดที่ได้จากการใช้ hexane เป็น solvent นั้นมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ต่ำมากดังแสดงในตารางที่ 6 และเมื่อพิจารณาผลของชนิดตัวอย่างพืชทดสอบที่ใช้ต่อความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัดก็พบว่า ชนิดของตัวอย่างพืชทดสอบไม่มีผลต่อความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของ aqueous extracts ในขณะที่ชนิดของ

ตัวอย่างพืชทดสอบมีผลต่อความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของ ethanol extracts และ hexane extracts อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะใน ethanol extracts ที่แสดงความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงนั้น ก็จะพบว่า ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงที่สุด (61.46 ± 0.15 มิลลิกรัม GAE/กรัม crude extracts) รองลงมาคือ ethanol extracts ของ รากผักหนาม รากต้นจี่หนอน รากต้นกระถิน และการรวมตัวอย่างพืช ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของ crude extracts ที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water

ชนิดของ crude extract	มิลลิกรัม GAE/ กรัม crude extracts		
	hexane ^C	ethanol ^A	hot water ^B
เปลือกต้นเพกา	1.44 ± 0.41^a	61.46 ± 0.15^a	15.16 ± 3.39^a
รากต้นกระถิน	1.68 ± 0.59^a	52.14 ± 4.56^b	12.19 ± 2.29^a
รากผักหนาม	0.65 ± 0.23^b	55.19 ± 1.42^b	15.00 ± 2.55^a
รากต้นจี่หนอน	1.10 ± 0.82^{ab}	53.49 ± 1.90^b	15.22 ± 4.59^a
การรวมตัวอย่างพืช*	0.66 ± 0.30^b	44.56 ± 5.07^c	13.86 ± 2.26^a

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอนมาผสมรวมกัน ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=9)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน (A-C) และคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ สามารถกล่าวได้ว่า crude extracts ที่สกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด รองลงมา คือ hot water และ hexane ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกันทั้งวิธี DPPH (ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ) และวิธี FRAP (ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์) แสดงว่า สารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างพืชทดสอบได้มากเมื่อใช้ solvent ที่มีขี้ ซึ่งมียางานที่ ได้แสดงให้เห็นว่า ความมีขี้ของ solvent ที่ใช้ในการสกัดอาจมีผลต่อการละลายของ bioactive compound ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืชออกมาได้มากขึ้น (Al-Dabbas และคณะ 2006; Mohsen และคณะ 2009) และในกรณีนี้จะเห็นได้ว่า สารสกัดที่ได้จากการใช้ solvent ที่ไม่มีขี้ อย่างเช่น hexane นั้นแทบจะไม่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเลย นอกจากนี้

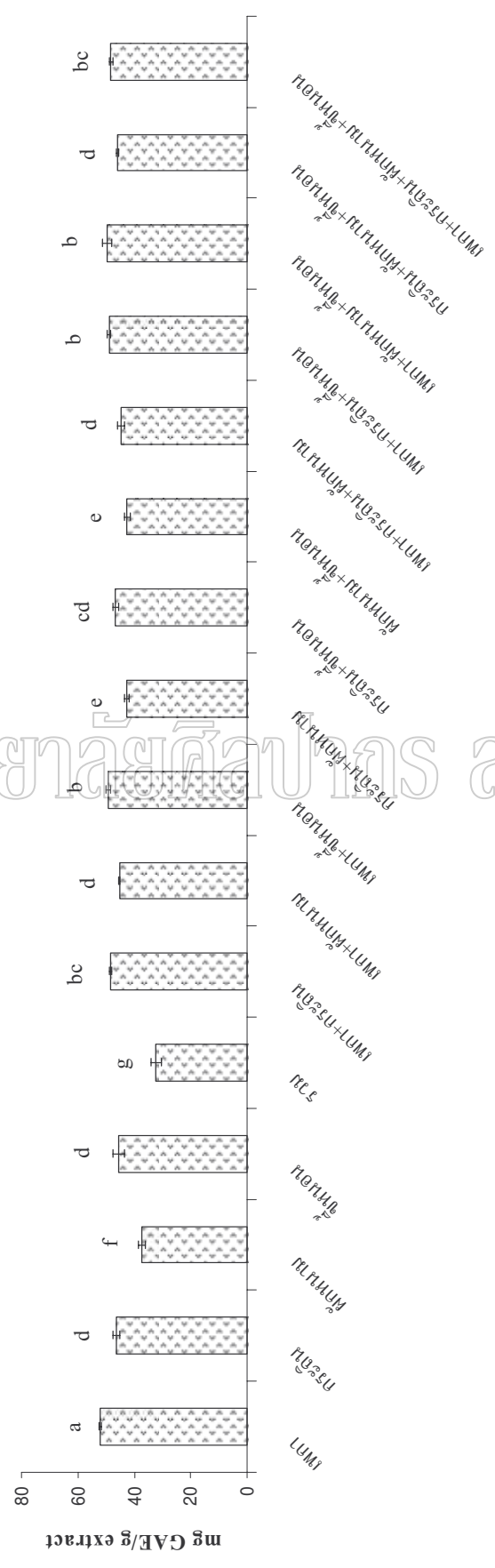
รายงานการวิจัยของ Karthikumar และคณะ (2007) ก็ยังได้ชี้ให้เห็นว่า การใช้ solvent ที่มีขี้จะให้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการใช้ solvent ที่ไม่มีขี้ โดยเขาได้ทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของใบกระเม็ง (*Eclipta prostrata* L.) ที่สกัดด้วย hexane, ethyl acetate, ethanol และ water แล้วพบว่า การใช้ ethanol เป็น solvent ให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด รองลงมาคือ ethyl acetate, water และ hexane ตามลำดับ

และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ethanol กับ hot water ก็จะเห็นว่า การสกัดด้วย ethanol จะให้สารสกัดที่แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่า ซึ่งความมีขี้ของ ethanol ที่น้อยกว่า water นี้ อาจเหมาะสมต่อการละลายเอา bioactive compounds ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบออกมาได้มาก ซึ่งก็มีงานวิจัยอื่นที่ได้รายงานผลในทำนองนี้เช่นกัน โดยชนศักดิ์ และคณะ (2551) ได้ประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ DPPH assay และ ABTS assay ของกระชายเหลืองที่สกัดด้วย solvent ชนิดต่างๆ ได้แก่ acetone, 80% ethanol, 80% methanol และ water แล้วพบว่า กระชายเหลืองที่สกัดด้วย 80% ethanol มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันทั้ง 2 วิธีสูงกว่ากระชายเหลืองที่สกัดด้วย water แต่ในบางกรณีก็อาจพบว่า การใช้ solvent ที่ไม่มีขี้จะให้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า การใช้ solvent ที่มีขี้ เช่น ในการทดลองของ Herrero และคณะ (2004) ที่ได้เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่สกัดด้วย hexane, light petroleum, ethanol และ water พบว่า สาหร่ายที่สกัดด้วย hexane มี EC_{50} ต่ำที่สุด รองลงมา คือ ethanol, petroleum ether และ water ตามลำดับ

นอกเหนือไปจากการพบว่า ชนิดของ solvent ที่ใช้ในการสกัดสารออกมาจากตัวอย่างพืชทดสอบจะมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีอีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจ นั่นคือ ในกรณีของการรวมตัวอย่างพืช ซึ่งเป็นการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์อย่างละ 5 กรัมมาสกัดด้วย solvent ต่างๆ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ซึ่งกลับพบว่า ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระนั้นต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิด ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า สารที่ถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างพืชที่นำมารวมกันอาจมีฤทธิ์ต่อต้านกันเอง หรือ อาจทำปฏิกิริยาต่อกันไปอยู่ในรูปที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระที่ด้อยลง หรือ เกิดการยับยั้งการสกัดสารบางชนิดออกมาจากตัวอย่างพืช ดังนั้น จึงได้ทำการทดลองเพื่อที่จะอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าว โดยการนำ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชชนิดต่างๆ มาผสมกัน แล้วนำไปหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์โดยวิธี FRAP ซึ่งจากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 26 พบว่า สารสกัดจากเปลือกต้นเพกา ยังคงมีประสิทธิภาพสูงที่สุด และเมื่อมีการนำสารสกัดจากตัวอย่างพืช 2 ชนิดมาผสมกันจะเห็นได้

ว่า ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์จะอยู่ตรงกลางระหว่างความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัดจากตัวอย่างพืชทดสอบ 2 ชนิดที่นำมารวมกัน สำหรับในกรณีที่มีการผสมสารสกัดจากตัวอย่างพืช 3 ชนิดก็ให้ผลในการทำงานเดียวกัน และเมื่อพิจารณาจากการนำสารสกัดจากตัวอย่างพืชทั้ง 4 ชนิดมารวมกันก่อนนำไปทดสอบก็จะเห็นได้ว่า ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ก็ยังเป็นผลมาจากค่าเฉลี่ยของความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัดจากตัวอย่างพืชแต่ละชนิด และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระก็ไม่ได้ด้อยลง ซึ่งหากนำไปเปรียบเทียบกับการนำตัวอย่างพืชทั้ง 4 ชนิดมารวมกันก่อนที่จะนำไปสกัดด้วย solvent แล้วค่อยนำสารสกัดรวมไปทดสอบจะเห็นว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระนั้นลดลงไปเป็นอย่างมาก ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่า สารออกฤทธิ์ต่างๆ จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิดถูกสกัดออกมาได้ไม่เต็มที่ หรือ อาจถูกสกัดออกมาแล้วมาทำปฏิกิริยาต่อกันก็อาจเป็นได้ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจึงควรแยกสกัดตัวอย่างพืชแต่ละชนิดน่าจะดีกว่า

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



ชนิดของสารสกัด

ภาพที่ 26 ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของตัวอย่างพืชตั้งแต่ 1 ชนิดขึ้นไปที่ได้ใช้ ethanol เป็น solvent ; ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3) ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) รวมถึง การนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากฝักหนาม และรากต้นชันชอนมาผสมรวมกันอย่างละ 5 กรัมก่อนนำไปสกัดด้วย solvent ชนิดต่างๆ



2.3 การป้องกันการถูกทำลายของ DNA

ในการทดลองนี้ได้นำประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของดีเอ็นเอของ crude extracts ด้วย ซึ่งทำโดยผสม crude extracts กับ calf thymus DNA แล้วนำไปบ่มกับสารละลาย Fenton's reagent เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการเติม crude extracts เพื่อดูรูปแบบและลักษณะการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมื่อแยกบน agarose gel ซึ่งหากดีเอ็นเอถูกทำลายจะมีขนาดเล็กลง เมื่อนำไปแยกขนาดตามน้ำหนักโมเลกุล (Run) บน 1% agarose gel จะทำให้เห็นการแยกขนาดของดีเอ็นเอในลักษณะที่เป็นปื้น (Smear) จากด้านบนมายังด้านล่างของแผ่นเจล หากดีเอ็นเอถูกทำลายมากจะเห็นลักษณะเป็นปื้นยาว เพราะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าและถูกแยกขนาดออกมาที่ด้านล่างของแผ่นเจล ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่ถูกทำลายหรืออาจถูกทำลายเพียงเล็กน้อยจะแยกให้เห็นแถบ (Band) ที่ชัดเจนตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลของมันและมีลักษณะที่เป็นปื้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

จากการทดลองได้เลือก crude extracts ที่สกัดด้วย ethanol มาทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของดีเอ็นเอ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากวิธี DPPH และ FRAP สูงที่สุด โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ EC_{50} มาทดลองบ่มกับ calf thymus DNA ให้ผลดังภาพที่ 27 ซึ่ง lane ที่ 1 คือ ดีเอ็นเอในสภาวะปกติ (Control) และ lane ที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่บ่มกับสารละลาย Fenton's reagent เห็นได้ว่า ดีเอ็นเอใน lane ที่ 2 มีลักษณะเป็นปื้นและมีหางยาวกว่า lane ที่ 1 เนื่องจากดีเอ็นเอเกิดการออกซิเดชันและถูกทำลายโดยสารละลาย Fenton's reagent จึงถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ ทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอใน lane ที่ 1 ที่มีดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียว และเมื่อผสมดีเอ็นเอกับ crude extracts ก่อนนำไปบ่มกับสารละลาย Fenton's reagent (lane 3-7) พบว่า หางของดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลง แสดงให้เห็นว่า crude extracts สามารถป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอจากการเกิดออกซิเดชันได้ แม้จะเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ความเข้มข้นของ gallic acid ที่ EC_{50} (lane 8) สามารถป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี ดังนั้น หากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้สูงขึ้น คาดว่าน่าจะสามารถป้องกันดีเอ็นเอได้ดีขึ้น

เมื่อเพิ่มปริมาณ crude extracts เป็น 20-100 ไมโครกรัม พบว่า crude extracts สามารถป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอได้ดีขึ้นโดย lane ที่ 1 คือ ดีเอ็นเอในสภาวะปกติ (Control) และ lane ที่ 2 คือ DNA ที่บ่มกับสารละลาย Fenton's reagent และ lane ที่ 3-7 คือ ดีเอ็นเอที่ผสมกับ crude extracts ก่อนนำไปบ่มกับสารละลาย Fenton's reagent เห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ crude extracts มากขึ้นจะทำให้หางของดีเอ็นเอค่อยๆ สั้นลง ตามลำดับ (ภาพที่ 28) แสดงให้เห็นว่า crude extracts สามารถป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอจาก Fenton's reagent ได้ นั่นคือ crude extracts ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จะสามารถป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอจากการ

เกิดออกซิเดชันได้ ซึ่งสารสกัดเหล่านี้อาจมีกลไกในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ทั้งยังสามารถลด cytochrome c และระดับ ferric ion และยับยั้งการเกิด sugar oxidation ของ calf thymus DNA ได้เช่นเดียวกับกลไกการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ DNA ของสารสกัดจากมะขามป้อม (*Emblica officinalis*) ขมิ้น (*Curcuma longa*) (Kumar และคณะ 2006) และใบกะหรี (curry leaves) (Ningappa และคณะ 2008)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มปริมาณ crude extracts มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงค่าหนึ่ง พบว่าความยาวของหางดีเอ็นเอเริ่มมีแนวโน้มคงที่ และไม่สามารถทำให้หางของดีเอ็นเอกลับมาสั้นได้เหมือน control ดังแสดงในภาพที่ 28 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของดีเอ็นเอได้เพียงบางส่วนเท่านั้น



Lane 1: Calf thymus DNA (native DNA)

Lane 2: Calf thymus DNA + Fenton's reagent

Lane 3: Calf thymus DNA + Fenton's reagent + EC₅₀ ของเพกา

Lane 4: Calf thymus DNA + Fenton's reagent + EC₅₀ ของกระถิน

Lane 5: Calf thymus DNA + Fenton's reagent + EC₅₀ ของผักหนาม

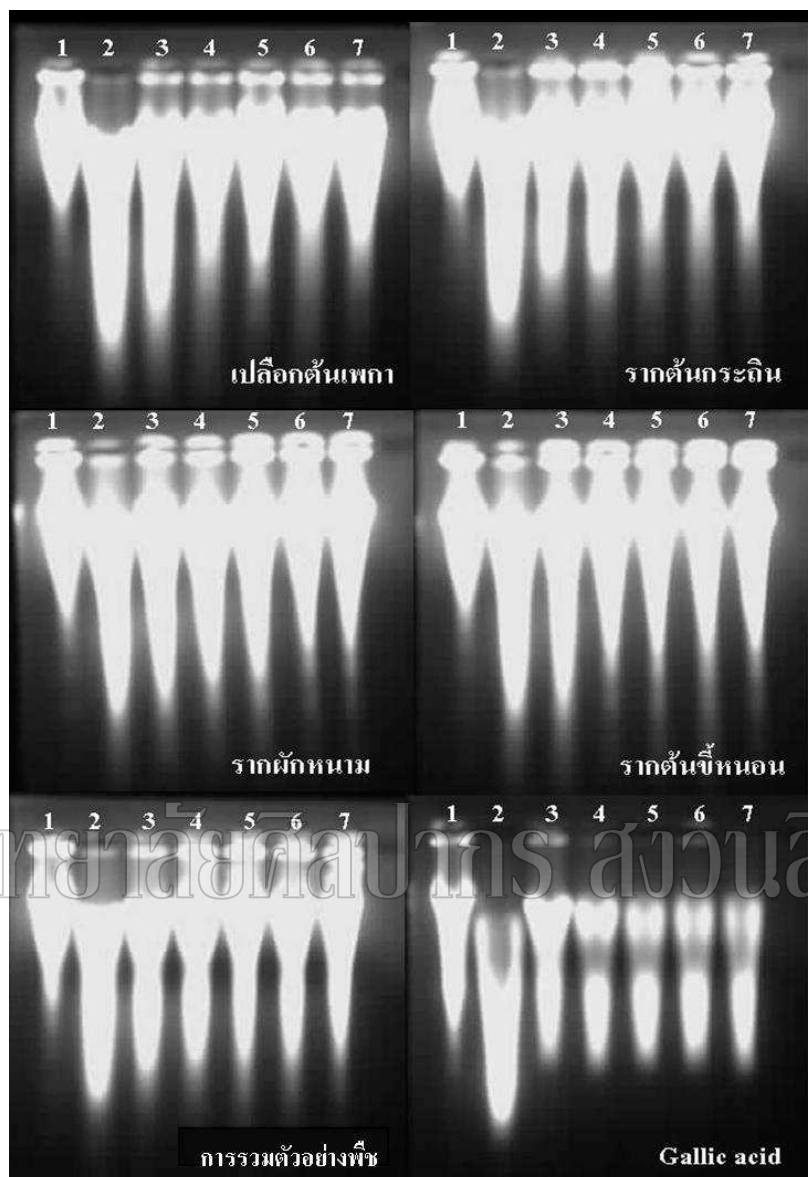
Lane 6: Calf thymus DNA + Fenton's reagent + EC₅₀ ของขี้หนอน

Lane 7: Calf thymus DNA + Fenton's reagent + EC₅₀ ของการรวม

ตัวอย่างพืช

Lane 8: Calf thymus DNA + Fenton's reagent + EC₅₀ ของ gallic acid

ภาพที่ 27 ดีเอ็นเอที่ผสมกับ ethanol extracts เมื่อถูกทำลายด้วยสารละลาย Fenton's reagent



Lane 1 : Calf thymus DNA (native DNA)

Lane 2 : Calf thymus DNA + Fenton's reagent

Lane 3 : Calf thymus DNA + Fenton's reagent + สารสกัด 20 ไมโครกรัม

Lane 4 : Calf thymus DNA + Fenton's reagent + สารสกัด 40 ไมโครกรัม

Lane 5 : Calf thymus DNA + Fenton's reagent + สารสกัด 60 ไมโครกรัม

Lane 6 : Calf thymus DNA + Fenton's reagent + สารสกัด 80 ไมโครกรัม

Lane 7 : Calf thymus DNA + Fenton's reagent + สารสกัด 100 ไมโครกรัม

ภาพที่ 28 ดีเอ็นเอที่ผสมกับ ethanol extracts เมื่อถูกทำลายด้วยสารละลาย Fenton's reagent

3. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) ทำได้โดยผสม crude extracts กับ สารละลาย Folin–Ciocalteu reagent และสารละลาย sodium carbonate solution ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ซึ่งหาก crude extracts มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงก็จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงตามไปด้วย โดยในการทดลองได้ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ดังนั้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะแสดงในรูปของมิลลิกรัม standard equivalent/กรัม ของ crude extracts (มิลลิกรัม GAE /กรัม crude extracts) เช่นเดียวกับการรายงานผลของความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ และหาก crude extracts มีค่า GAE สูงก็แสดงว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงด้วย

ผลการทดลองในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า ชนิดของ solvent ที่ใช้ในการสกัดสารออก จากตัวอย่างพืชทดสอบมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกในสารที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดย ethanol extracts ให้ปริมาณฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือ aqueous extracts และ hexane extracts ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงผลของชนิดของตัวอย่างพืชที่ใช้ต่อปริมาณฟีนอลิกในสารที่สกัดได้ จะเห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ของปริมาณฟีนอลิกที่วัดได้ในกลุ่มของ crude extracts ที่ใช้ ethanol และ hot water เป็น solvent ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างในกลุ่มของ crude extracts ที่ใช้ hexane เป็น solvent โดยในกลุ่มของ ethanol extracts นั้นจะเห็นว่า สารสกัดจาก เปลือกต้นเพกามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากรากผักหนาม รากต้น กระถิน การรวมตัวอย่างพืช และรากต้นขี้หนอน ตามลำดับ ส่วนในกรณีของ aqueous extracts นั้น จะเห็นว่า สารสกัดจากรากผักหนามมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด ตามมาด้วยสารสกัดจากเปลือกต้น เพกา รากต้นขี้หนอน การรวมตัวอย่างพืช และรากต้นกระถิน

จากการทดลองเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH (ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ) และวิธี FRAP (ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์) รวมถึง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า crude extracts ที่ใช้ ethanol เป็น solvent มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือ crude extracts ที่ใช้ hot water เป็น solvent ในขณะที่แทบจะไม่พบความสามารถนี้เมื่อใช้ hexane เป็น solvent และยังมี ปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมดต่ำที่สุดด้วย ซึ่งความสัมพันธ์ที่แปรผันตามกันระหว่างความสามารถในการ ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณของฟีนอลิกนี้อาจกล่าวได้ว่า ฟีนอลิกน่าจะเป็นกลุ่มสารหลักที่ทำให้พืช ที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ แต่จะเป็นสารชนิดใดนั้นจำเป็นต้องมีการ วิเคราะห์กันต่อไป ซึ่งอาจเป็นสารชนิดที่เคยมีรายงานไว้ก็อาจเป็นไปได้ เป็นต้นว่า มีรายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกที่พบในเพกา คือ oroxylin A และ chrysin (Babu และคณะ 2005 และ 2006)

สารที่พบในเมล็ดกระถิน คือ C-glycosidic 2-propanol derivative และ sulphated derivative (Gamal-Eldeen และคณะ, 2007) สารที่พบในฝักหนาม คือ flavone C-glycosides, flavonols, flavones และ proanthocyanidins (Thi Hong Van และคณะ 2006) และสารที่พบในรากจืดันจี่หนอน คือ genistein (Yen และคณะ, 2001) ซึ่งเหล่านี้จัดเป็นสารทุติยภูมิที่อาจทำให้พืชมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้

และผลจากการประเมินคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นที่ได้ทำในการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ethanol extract จากเปลือกต้นเพกามีฤทธิ์สูงสุด ตามมาด้วย ethanol extracts จากรากฝักหนาม รากต้นกระถิน และรากต้นจี่หนอน ซึ่งสารสกัดจากตัวอย่างพืช 3 ชนิดหลังนี้เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองตามหลักสถิติแล้วพบว่า มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนสารสกัดจากการรวมตัวอย่างพืชนั้นจะให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกต่ำที่สุด

ตารางที่ 7 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ crude extracts ที่สกัดด้วย hexane, ethanol และ hot water

ชนิดของสารสกัด	มิลลิกรัม GAE /กรัม crude extracts		
	hexane ^C	ethanol ^A	water ^B
เปลือกต้นเพกา	1.09 ± 0.48 ^a	69.95 ± 2.66 ^a	24.47 ± 6.11 ^b
รากต้นกระถิน	1.38 ± 0.79 ^a	57.69 ± 2.72 ^b	15.54 ± 3.76 ^c
รากฝักหนาม	1.50 ± 0.65 ^a	64.31 ± 5.02 ^{ab}	33.07 ± 4.66 ^a
รากต้นจี่หนอน	0.66 ± 0.20 ^a	40.96 ± 3.68 ^c	22.97 ± 0.15 ^b
การรวมตัวอย่างพืช*	0.49 ± 0.05 ^a	46.34 ± 3.89 ^c	22.51 ± 1.27 ^{bc}

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากฝักหนาม และรากต้นจี่หนอนมาผสมรวมกัน

ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=9)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน (A-C) และคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

4. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของ crude extracts หาได้โดยวิธี paper discs method ซึ่งเป็นารวัดขนาดของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ crude extracts นอกจากนี้ยังได้ทำการหาความเข้มข้นของ crude extracts ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือก็คือ ค่า MIC (Minimum inhibition concentration) โดยการทดลองครั้งนี้ได้เลือก crude extracts ที่สกัดด้วย ethanol มาหาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 2 วิธี เพราะ ethanol extracts มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งคาดว่ากลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกใน crude extracts ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ด้วย

4.1 การยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี Paper discs method

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี paper discs method ทำได้โดยวางแผ่นกระดาษกรองที่มีการเติม crude extracts ปริมาณต่างๆ ลงบนอาหารวุ้นที่มีแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลโดยสังเกตขนาดของ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ crude extracts ซึ่ง clear zone หมายถึง บริเวณที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้น ขนาดของ clear zone รอบๆ แผ่นกระดาษกรองที่มีการเติม crude extracts จึงมีความสัมพันธ์ทางตรงกับประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย นั่นคือ หาก crude extracts สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีก็จะมี clear zone ขนาดใหญ่

ในการทดลองได้ใช้ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชทดสอบชนิดต่างๆ ในปริมาณ 1-5 มิลลิกรัม เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ได้แก่ *Salmonella enteritica* serovar Enteritidis, *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium และ *Escherichia coli* และจากผลการทดลองที่ได้ในตารางที่ 8-13 แสดงให้เห็นว่า ethanol extracts จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ได้แตกต่างกัน สังเกตได้จากการเกิด clear zone ที่มีขนาดแตกต่างกัน และภาพที่ 29 ก็แสดงตัวอย่างลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ของ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชทดสอบต่างๆ โดย ethanol extracts จากตัวอย่างพืชทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แกรมบวกได้ 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *B. cereus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบอีก 2 ชนิดคือ *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณของ ethanol extracts ที่ใช้ยังน้อยเกินไปที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ได้ ดังนั้น จึงได้เพิ่มระดับของ ethanol extracts ให้สูงขึ้นเป็น 10, 12.5

และ 15 มิลลิกรัม เพื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* อีกครั้ง และผลที่ได้พบว่า ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกาสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ได้ ในขณะที่ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชอื่นๆ ยังคงไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ได้ แสดงให้เห็นว่า ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่เลือกมาทดลองสูงที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถของ ethanol extracts แต่ละชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่า ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ของเปลือกต้นเพการากต้นกระถิน รากผักหนาม และการนำตัวอย่างพืชมารวมกันไม่แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนรากต้นจี่หนอนนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียต่ำที่สุด (ตารางที่ 8) ในขณะที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ของ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิดสำหรับการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* (ตารางที่ 9) นั่นคือ รากต้นกระถินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงที่สุด รองลงมาคือ รากต้นผักหนาม เปลือกต้นเพกา และการนำตัวอย่างพืชมารวมกัน ซึ่งรากต้นจี่หนอนยังคงมีประสิทธิภาพต่ำที่สุด แต่สำหรับกรณีการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* (ตารางที่ 10-13) มีเพียง ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกาเท่านั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียเหล่านี้ได้

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงระดับของ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชที่ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ นั่นคือ ปริมาณของ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชทั้งหมดที่อยู่ในช่วง 1-5 มิลลิกรัมที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *B. cereus* และปริมาณของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกาที่อยู่ในช่วง 10-15 มิลลิกรัมที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* พบว่า ปริมาณของ ethanol extracts ที่ใช้มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *B. cereus* และ *S. enteritidis* อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ เมื่อเพิ่มปริมาณ ethanol extracts ให้สูงขึ้นประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก็จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยจะมีขนาดของ clear zone ที่ใหญ่ขึ้น แต่กลับไม่พบความแตกต่างทางสถิติของ ethanol extracts สำหรับการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชทั้งหมดไปเปรียบเทียบกับ chloramphenicol ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ ก็พบว่า ethanol extracts จากทุกตัวอย่างพืชทดสอบยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่ำกว่ามาก ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะ chloramphenicol เป็นสารบริสุทธิ์ที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างเต็มที่ เช่นเดียวกับ gallic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์จึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง ในขณะที่สารสกัดจากพืชที่นำมาทดลองเป็นเพียง crude extracts ที่มีสารหลายชนิดที่ถูกสกัดออกมาผสมกันอยู่และยังไม่ได้

ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสารต่างๆ ที่ผสมกันอยู่นี้อาจมีทั้งชนิดที่มีและไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ตารางที่ 8 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ของ ethanol extracts

ชนิด/ความเข้มข้น (mg) ของ crude extracts	ขนาดของบริเวณใส (มิลลิเมตร)				
	1	2	3	4	5
เปลือกต้นเพกา ^b	1.5 ± 0.00	2.8 ± 0.25	3.9 ± 0.12	4.4 ± 0.17	4.9 ± 0.12
รากต้นกระถิน ^b	1.2 ± 0.29	2.3 ± 0.29	3.3 ± 0.29	4.2 ± 0.29	4.3 ± 0.29
รากผักหนาม ^b	1.7 ± 0.29	2.5 ± 0.50	3.5 ± 0.50	4.8 ± 0.29	5.0 ± 0.50
รากต้นจันทน์ ^c	0.7 ± 0.29	1.0 ± 0.00	1.3 ± 0.29	2.3 ± 0.29	3.2 ± 0.58
*การรวมตัวอย่างพืช ^b	1.7 ± 0.29	2.5 ± 0.50	3.3 ± 0.29	4.2 ± 0.29	4.5 ± 0.50
**Chloramphenicol ^a	10.0 ± 1.0	10.7 ± 2.52	11.5 ± 0.50		

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์มาผสมรวมกัน

** ใช้ chloramphenicol ปริมาณเท่ากับ 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของ ethanol extracts

ชนิด/ความเข้มข้น (mg) ของ crude extracts	ขนาดของบริเวณใส (มิลลิเมตร)				
	1	2	3	4	5
เปลือกต้นเพกา ^{cd}	0.5 ± 0.00	1.3 ± 0.25	1.4 ± 0.12	1.5 ± 0.00	1.6 ± 0.12
รากต้นกระถิน ^b	1.2 ± 0.29	1.8 ± 0.29	1.8 ± 0.29	1.8 ± 0.29	1.8 ± 0.29
รากผักหนาม ^c	1.0 ± 0.00	1.7 ± 0.29	1.7 ± 0.29	1.0 ± 0.00	1.5 ± 0.00
รากต้นจันทน์ ^c	0.3 ± 0.00	0.3 ± 0.00	0.3 ± 0.00	0.4 ± 0.13	0.8 ± 0.29
*การรวมตัวอย่างพืช ^d	0.3 ± 0.00	0.8 ± 0.29	1.5 ± 0.50	1.3 ± 0.29	1.3 ± 0.29
**Chloramphenicol ^a	7.7 ± 0.58	10.3 ± 1.15	12.0 ± 1.00		

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์มาผสมรวมกัน

** ใช้ chloramphenicol ปริมาณเท่ากับ 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-e) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 10 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* ของ ethanol extracts

ชนิด/ความเข้มข้น (mg) ของ crude extracts	ขนาดของบริเวณใส (มิลลิเมตร)		
	10	12.5	15
เปลือกต้นเพกา ^b	0.9 ± 0.12	0.9 ± 0.12	1.0 ± 0.00
รากต้นกระถิน ^c	0	0	0
รากผักหนาม ^c	0	0	0
รากต้นจันทน์ ^c	0	0	0
*การรวมตัวอย่างพืช ^c	0	0	0
**Chloramphenicol ^a	12.0 ± 1.00	14.0 ± 1.32	14.7 ± 0.58

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์มาผสมรวมกัน

**ใช้ chloramphenicol ปริมาณเท่ากับ 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 11 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. enteritidis* ของ ethanol extracts

ชนิด/ความเข้มข้น (mg) ของ crude extracts	ขนาดของบริเวณใส (มิลลิเมตร)		
	10	12.5	15
เปลือกต้นเพกา ^b	0.5 ± 0.00	0.7 ± 0.29	1.0 ± 0.00
รากต้นกระถิน ^c	0	0	0
รากผักหนาม ^c	0	0	0
รากต้นจันทน์ ^c	0	0	0
*การรวมตัวอย่างพืช ^c	0	0	0
**Chloramphenicol ^a	12.2 ± 0.29	13.3 ± 0.29	14.2 ± 0.29

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์มาผสมรวมกัน

**ใช้ chloramphenicol ปริมาณเท่ากับ 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 12 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. typhimurium* ของ ethanol extracts

ชนิด/ความเข้มข้น (mg) ของ crude extracts	ขนาดของบริเวณใส (มิลลิเมตร)		
	10	12.5	15
เปลือกต้นเพกา ^b	0.8 ± 0.29	0.9 ± 0.17	1.0 ± 0.00
รากต้นกระถิน ^c	0	0	0
รากผักหนาม ^c	0	0	0
รากต้นจันทน์ ^c	0	0	0
*การรวมตัวอย่างพืช ^c	0	0	0
**Chloramphenicol ^a	12.3 ± 0.29	12.8 ± 0.29	13.0 ± 0.00

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์มาผสมรวมกัน

**ใช้ chloramphenicol ปริมาณเท่ากับ 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 13 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ของ ethanol extracts

ชนิด/ความเข้มข้น (mg) ของ crude extracts	ขนาดของบริเวณใส (มิลลิเมตร)		
	10	12.5	15
เปลือกต้นเพกา ^b	0.8 ± 0.29	0.9 ± 0.12	1.0 ± 0.00
รากต้นกระถิน ^c	0	0	0
รากผักหนาม ^c	0	0	0
รากต้นจันทน์ ^c	0	0	0
*การรวมตัวอย่างพืช ^c	0	0	0
**Chloramphenicol ^a	9.8 ± 1.04	10.3 ± 0.58	12.0 ± 1.00

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์มาผสมรวมกัน

**ใช้ chloramphenicol ปริมาณเท่ากับ 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-c) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพที่ 29 ลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus*; ethanol extracts ปริมาณ 1-5 มิลลิกรัม และ chloramphenicol ปริมาณ 0.05, 0.1 และ 0.15 มิลลิกรัม

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ในระดับของ ethanol extracts ที่ใช้ในการทดสอบเปลือกต้นเพกาสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในขณะที่ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* และ *B. cereus* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณของ ethanol extracts ที่ใช้น้อยเกินไปและไม่เพียงพอในการยับยั้งแบคทีเรียเหล่านี้ เนื่องจากยังเป็นเพียงสารสกัดหยาบ หรือการใช้ ethanol เป็น solvent อาจสามารถดึงเอาตัวยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียออกมาจากตัวอย่างพืชได้เพียงเล็กน้อย หรืออาจเป็นไปได้ที่ตัวอย่างพืช ได้แก่ รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจี่หนอนไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ในระดับปริมาณที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้ อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย ก็คือ กลไกการออกฤทธิ์ของ crude extracts ซึ่งการออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์หรือมีผลต่อเซลล์เมมเบรน ทำให้โครงสร้างผนังเซลล์ผิดปกติ และกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างโปรตีนบางชนิดซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 2544) โดยการที่ crude extracts จากตัวอย่างพืชทั้งหมดสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก อาจเป็นเพราะมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจาก แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน คือ แบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์เพียงชั้นเดียวและประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบบมีผนังเซลล์ถึง 2 ชั้นซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่าและยังมีไขมัน (Phospholipid) เป็นองค์ประกอบสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีรายงานว่ายาปฏิชีวนะบางชนิดออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยมีผลไปลดฟอสโฟลิปิดที่ผนังเซลล์ ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์ผิดปกติ (Sareen และ Khuller, 1988) ดังนั้น แบคทีเรียแกรมบวกจึงถูกทำลายได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และอาจเป็นไปได้ที่ crude extracts จากตัวอย่างพืชทดสอบมีผลต่อฟอสโฟลิปิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จึงสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบนอกจากนี้ ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบยังมีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น endotoxin ทำให้แบคทีเรียแกรมลบบมีความเป็นพิษมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และ endotoxin นี้ อาจมีผลไปยับยั้งการออกฤทธิ์ของ crude extracts ทำให้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียลดลง ในขณะที่กลไกการออกฤทธิ์ของ chloramphenicol ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะมีผลยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดที่พบในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม เช่น ลูซีน (Lucine) จึงทำให้ chloramphenicol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Wilson 1996; Coventry และ Dilworth 1975)

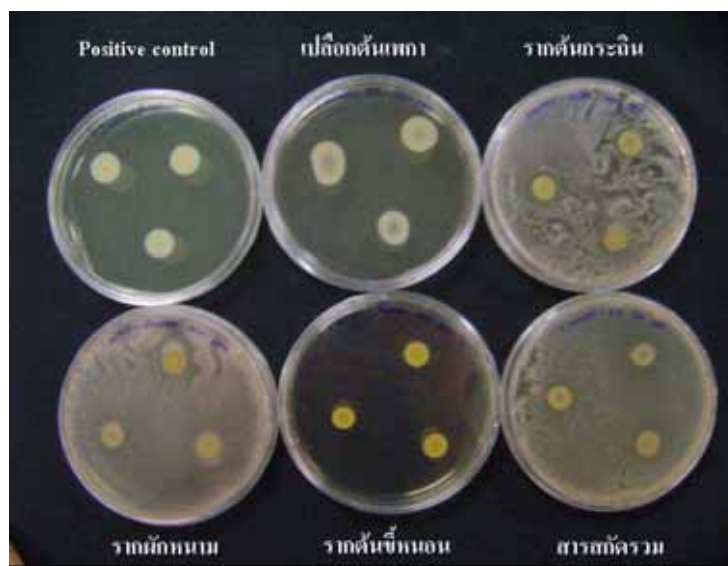
จากผลการทดลองที่พบว่า ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบนี้ อาจเป็นผลมาจากการมีสาร oroxylin A และ chrysin เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีรายงานที่ชี้ให้เห็นว่า อนุพันธ์สังเคราะห์ของ oroxylin A และ chrysin สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *B. subtilis*, *B. sphaericus* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *C. violaceum*, *K. aerogenes* และ *P. aeruginosa* ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหากทำให้ crude extracts จากเปลือกต้นเพกาหรือตัวอย่างพืชอื่นๆ มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ก็จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ดีขึ้น และจากความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าว อาจสามารถนำพืชสมุนไพรเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ เช่น การนำมาผสมในเครื่องสำอาง รักษาสิว ฝ้า หรือหนอง ที่มีสาเหตุมาจาก *S. aureus* และการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ฯลฯ

4.2 MIC test

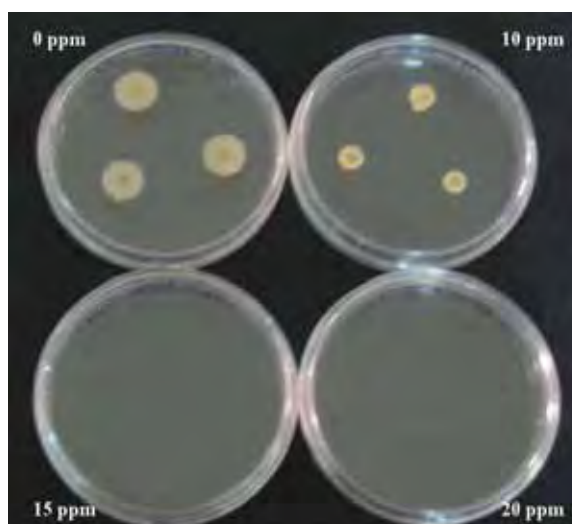
นอกจากการวัดขนาดของ clear zone โดยวิธี paper discs method แล้ว ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียยังวัดผลได้จากค่า MIC (Minimum inhibition concentration) โดย MIC หมายถึง ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ crude extracts ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำได้โดยผสม crude extracts กับอาหารวุ้นกึ่งแข็ง ลงบน plate เมื่อวุ้นเริ่มแข็งตัวจึงหยดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงบนวุ้น 3 จุด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเจริญของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหาร โดยหาก crude extracts มีความเข้มข้นเพียงพอในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ก็จะไม่พบแบคทีเรียเจริญบน plate ดังนั้น crude extracts ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีควรมีค่า MIC ที่ต่ำ

การทดลองได้เริ่มต้นใช้ระดับของ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ppm) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ จากนั้นจึงได้เพิ่มความเข้มข้นของ ethanol extracts ให้มากขึ้นจนกระทั่งถึง 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่สูงมากแต่ก็ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ได้ ดังนั้น จึงไม่สามารถหา MIC ของ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ได้ ในขณะที่เมื่อใช้ chloramphenicol ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะความเข้มข้นเพียง 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก็สามารถยับยั้งเจริญของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ได้แล้ว ดังนั้น MIC ของ chloramphenicol สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* คือ ประมาณ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตัวอย่างลักษณะเชื้อแบคทีเรีย

S. aureus ที่ขึ้นบน plate ที่มี ethanol extracts และ chloramphenicol แสดงในภาพที่ 30 และ 31 ตามลำดับ



ภาพที่ 30 ลักษณะของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารวุ้นกึ่งแข็งที่ผสม ethanol extracts จากตัวอย่างพืชชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร; positive control หมายถึง ไม่มี การเติม ethanol extracts



ภาพที่ 31 ลักษณะของแบคทีเรีย *S. aureus* ที่เจริญบนอาหารวุ้นกึ่งแข็งที่ผสม chloramphenicol; ความเข้มข้น 0, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี paper discs method แสดงให้เห็นว่า ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูงที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ในขณะที่ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชอื่นๆ สามารถยับยั้งได้เพียงแบคทีเรีย *S. aureus* และ *B. cereus* เท่านั้น นอกจากนี้ ยังไม่สามารถหาค่า MIC ของ ethanol extracts ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ใน ethanol extracts ยังไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์เพราะเป็นเพียงสารสกัดหยาบ จึงสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เพียงบางส่วนเท่านั้น และค่า MIC ของ ethanol extracts จากตัวอย่างพืชที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้นั้นอาจมีค่าสูง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ chloramphenicol ที่เป็นยาปฏิชีวนะและมีความบริสุทธิ์สูงกว่า จะพบว่า chloramphenicol มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าและมีค่า MIC ที่ต่ำ ซึ่งมีรายงานที่ชี้ให้เห็นว่าการใช้ crude extracts ในการยับยั้งแบคทีเรียจะต้องใช้ในปริมาณที่สูง เช่นในงานวิจัยของ Borisutpeth และคณะ (2005) ที่ทดสอบฤทธิ์ของ crude extracts จากใบต้นคูณ กล้วย และกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วย methanol และ water ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ซึ่งพบว่า ค่า MIC ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้นั้นมีค่าสูง อยู่ในระดับมิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไม่สามารถหาค่า MIC ของ crude extracts จากตัวอย่างพืชบางชนิดได้ แต่ก็มีบางงานวิจัยที่ได้ทำการแยกองค์ประกอบจากพืช เพื่อนำสารที่แยกได้ไปหาค่า MIC ซึ่งก็พบว่าองค์ประกอบที่แยกได้เหล่านั้นมีค่า MIC ที่ต่ำ อยู่ในระดับไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่น การทดลองของ Mokbel และ Hashinaga (2005) ซึ่งได้นำ crude extracts จากเปลือกกล้วยหอมมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี paper discs method ก่อนที่จะนำ crude extracts ไปแยกองค์ประกอบด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี ให้ได้สารที่มีบริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อนำมาทดสอบหาค่า MIC ซึ่งพบว่า MIC ของ malic acid, β -sitosterol และ succinic acid ที่พบในเปลือกกล้วยหอม อยู่ในช่วง 140-750 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และในการทดลองของ Rahman และ Gray (2005) ที่รายงานหาค่า MIC จากสารประกอบ benzoisofuranone derivative และ carbazole alkaloids ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในเปลือกต้นหอมแขก (*Murraya koenigii*) อยู่ในช่วง 3.13-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากงานวิจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า การหาค่า MIC หรือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์นั้น จำเป็นจะต้องใช้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง หรือมีการนำไปแยกองค์ประกอบก่อนจึงจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ในความเข้มข้นที่ต่ำ แต่หากใช้ crude extracts ก็จะต้องใช้ในความเข้มข้นที่สูงกว่ามาก ดังนั้นหากมีการนำ

crude extracts ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไปแยกองค์ประกอบให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ก็อาจจะสามารถหาค่า MIC ของ crude extracts เหล่านี้ได้

5. ความเป็นพิษและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง หาได้จากวิธี MTT โดยบ่ม crude extracts กับเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จึงบ่มเซลล์ต่อด้วยสารละลาย MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมงในที่มืด ตามด้วยสารละลาย DMSO แล้วตรวจวัดผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ซึ่งความมีชีวิตของเซลล์จะแปรผันตรงกับค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้น หาก crude extracts สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ก็จะมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง และเมื่อนำเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มาสร้างกราฟกับความเข้มข้นของ crude extracts ที่ใช้ก็จะสามารถหาค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) ได้ โดย IC_{50} หมายถึงความเข้มข้นของ crude extracts ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้บ่มกับ crude extracts โดยในการทดลองได้เลือก ethanol extracts จากตัวอย่างพืชต่างๆ มาทดสอบความสามารถนี้ เนื่องจาก ethanol extracts มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด และชนิดของเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบคือ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติคือ Vero ที่ได้จากเซลล์ไตลิง โดย ethanol extracts ที่มีประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็งที่ดี จะต้องสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ผลการทดลองที่ได้พบว่า ethanol extracts มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีแต่ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย และเมื่อพิจารณาถึงระดับความเข้มข้นของ ethanol extracts ที่ใช้ พบว่า ความเข้มข้นของ ethanol extracts มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือ เมื่อความเข้มข้นของ ethanol extracts เพิ่มขึ้นก็จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa และ Vero ได้มากขึ้นด้วยและทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ลดลง (ภาพที่ 32) ในขณะที่การใช้ gallic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa ได้ดีกว่าเซลล์ Vero แต่เมื่อความเข้มข้นของ gallic acid มากขึ้นจนถึง 0.05 mg/ml ก็จะมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 33)

จากกราฟเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ HeLa และ Vero สามารถนำมาหาค่า IC_{50} ของ ethanol extracts ได้ ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งพบว่า ethanol extracts จากตัวอย่างพืชทุกชนิดยกเว้นรากผักหนาม มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ โดยเห็นได้จากค่า IC_{50} ของ ethanol

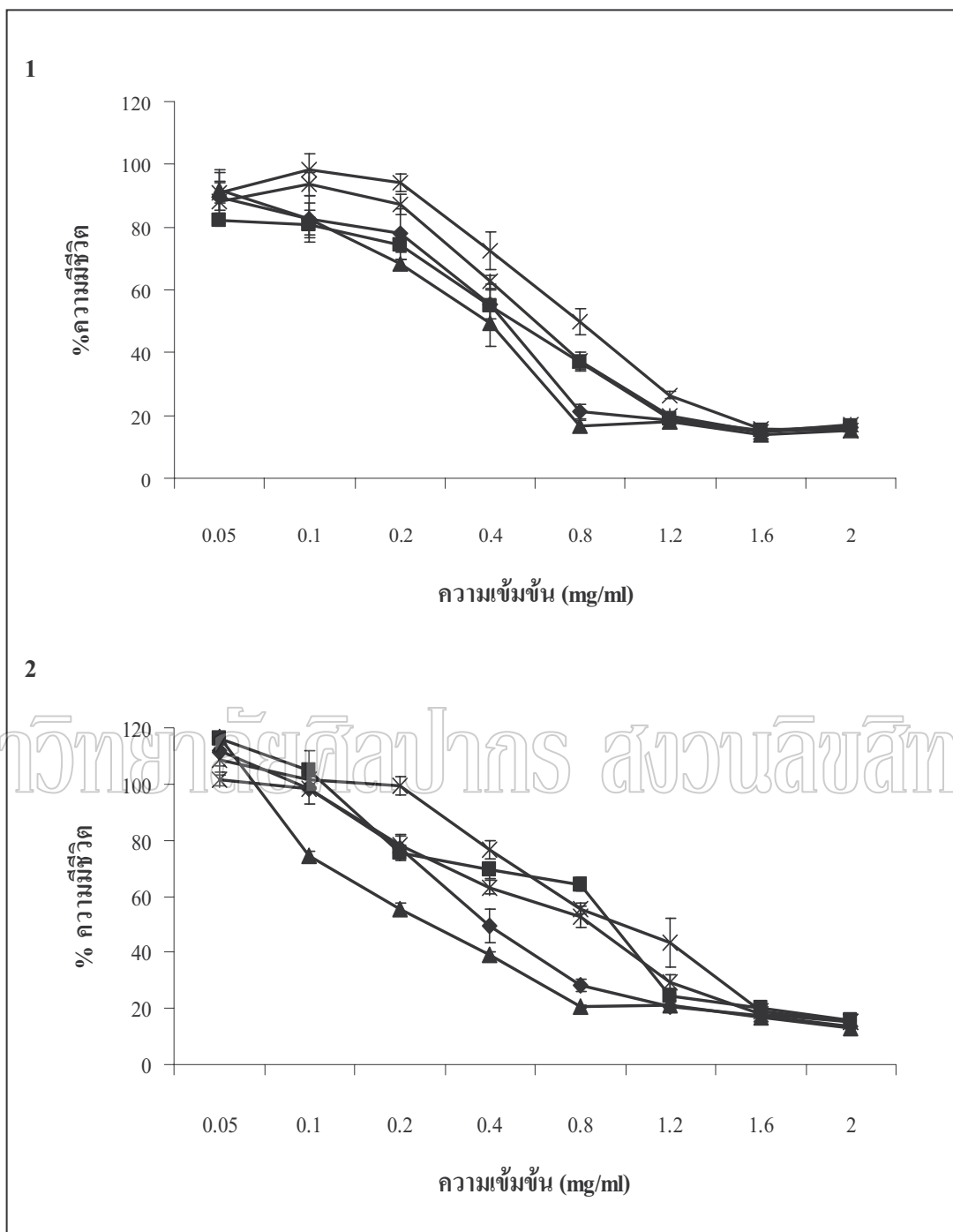
extracts ในการยับยั้งเซลล์ HeLa มีค่าต่ำกว่าเซลล์ Vero ในขณะที่ ethanol extracts จากรากผักหนาม กลับมีค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์ HeLa และ Vero เท่ากัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงชนิดของ ethanol extracts ในการยับยั้งเซลล์ HeLa และ Vero ก็พบว่า ชนิดของ ethanol extracts มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์ทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยรากผักหนามมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ HeLa และ Vero สูงที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 397 ± 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือเปลือกต้นเพกา การนำตัวอย่างพืชมารวมกัน รากต้นกระถิน และรากต้นจันทน์หอม ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่า IC_{50} ของ gallic acid ที่เป็นสารสังเคราะห์ในการยับยั้งเซลล์ Vero ยังมีค่าต่ำกว่าค่า IC_{50} ของ ethanol extracts มาก และไม่สามารถหา IC_{50} สำหรับเซลล์ HeLa ได้ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ HeLa ที่ได้จากการทดลองมีค่าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ อาจชี้ให้เห็นว่า การใช้ ethanol extracts และ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่ำๆ จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

ตารางที่ 14 ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (HeLa) และเซลล์ปกติ (Vero) ของ ethanol extracts

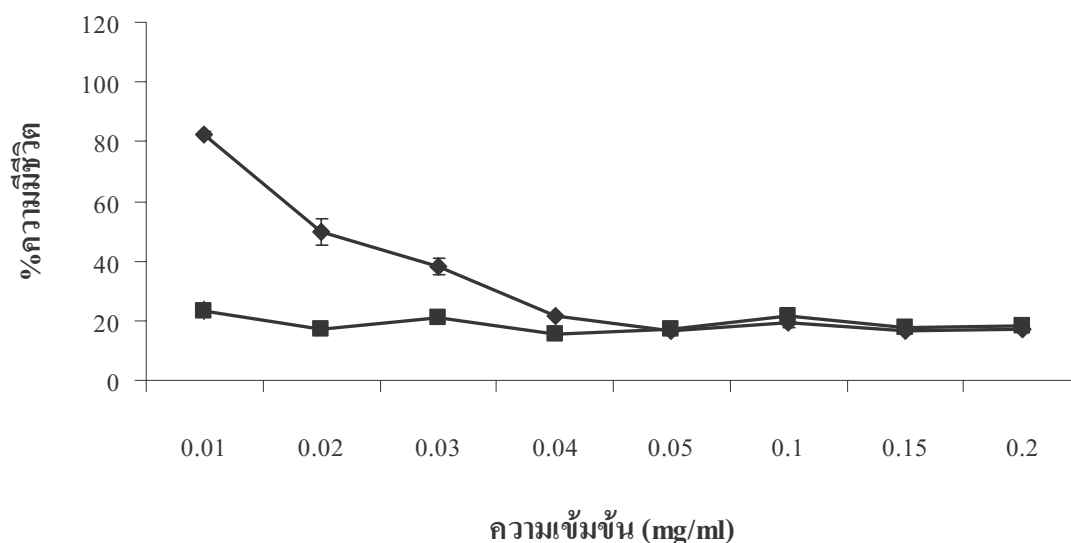
ชนิดของ crude extracts	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	
	HeLa	Vero
เปลือกต้นเพกา	470 ± 0.02^b	570 ± 0.03^c
รากต้นกระถิน	727 ± 0.04^d	1027 ± 0.01^c
รากผักหนาม	397 ± 0.05^a	397 ± 0.01^b
รากต้นจันทน์หอม	960 ± 0.02^c	1093 ± 0.04^f
การรวมตัวอย่างพืช*	607 ± 0.01^c	950 ± 0.02^d
Gallic acid	ไม่สามารถหาได้	23 ± 0.00^a

* สารสกัดจากการนำเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์หอมมาผสมรวมกัน ค่าที่แสดงในตาราง หมายถึง ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-f) หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 32 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa (1) และ Vero (2) ของ ethanol extracts: (◆) เปลือกต้นเพกา, (■) รากกระถิน, (▲) รากผักหนาม, (X) รากจี่หนอน และ (*) การรวมตัวอย่างพืช ; ค่าที่แสดง หมายถึง ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)



ภาพที่ 33 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ของ gallic acid : (◆) Vero และ (■) HeLa ; ค่าที่แสดง หมายถึง ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

มีการทดลองมากมายที่ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารต่างๆ ต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT ซึ่งสารทดสอบที่ใช้ก็มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ โดยที่ไม่ได้มีการรายงานผลเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ซึ่งไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้นเป็นพิษกับเซลล์ปกติด้วยหรือไม่ เช่น ในการทดลองของ Costa-Lotuflo และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการต่อต้านเซลล์มะเร็งของเปลือกต้นเพกาและพืชสมุนไพรอีก 10 ชนิด ซึ่งพบว่าเปลือกต้นเพกามีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง และมี IC_{50} อยู่ในช่วง 14 - 33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่ได้รายงานว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วยหรือไม่ แต่ก็มีบางการทดลองที่ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบทั้งต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติด้วย เช่น ในการทดลองของสิรินทร (2551) ที่ได้รายงานว่า สารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7), เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (U937) โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ได้จากไตลิง (Vero) อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถบอกได้ว่าหากความเข้มข้นของสารสกัดสูงกว่านี้จะจะเป็นพิษต่อเซลล์ Vero หรือไม่ และในการทดลองของ Sakurazawa และ Ohkusa (2005) ที่ได้ทดสอบผลของ organic acids 9 ชนิด ได้แก่ acetic acid, propionic acid, n-butyric acid, isobutyric acid, n-valeric acid, isovaleric acid, lactic acid, formic acid และ succinic acid ถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa, Vero, Hep-2 (เซลล์มะเร็งในก่อกองเสียง), DLD-1 (เซลล์ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย) และ NIH/3T3 (เซลล์เอ็มบริโอหนู) ซึ่งพบว่า organic acids ทั้ง 9 ชนิด

มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งหมด โดยความเข้มข้นของ organic acids แต่ละชนิดที่เป็นพิษต่อเซลล์
 หนึ่งๆ จะมีความใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า สารทดสอบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะมีความ
 เป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย แต่อาจต้องใช้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป และสารทดสอบที่ดีควรมี
 ผลยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติหรือเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยที่สุด เช่นเดียวกัน
 กับผลการทดลองในครั้งนี้ ที่พบว่า ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากจันทน์หอม
 และการนำตัวอย่างพืชมารวมกันมีค่า IC_{50} สำหรับเซลล์ HeLa ต่ำกว่าเซลล์ Vero นั่นคือ ethanol
 extracts มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ส่วน ethanol extracts จากรากผักหนาม
 นั้น แม้ว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงที่สุดแต่ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติสูงที่สุดด้วย
 เช่นกัน ซึ่งอาจไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ดังนั้น
 ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกาจึงเป็นสารสกัดที่น่าสนใจในการนำมายับยั้งเซลล์มะเร็งมาก
 ที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากการรวมตัวอย่างพืช รากต้นกระถิน และรากจันทน์หอม ตามลำดับ
 เพราะมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่ำ ซึ่งความสามารถ
 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HeLa และ Vero ของ ethanol extracts เหล่านี้อาจเป็นผลมาจาก
 สารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชซึ่งมีฤทธิ์ต่อเซลล์แตกต่างกันไป ดังนั้น หากมีการนำพืชเหล่านี้ไป
 แยกองค์ประกอบ เพื่อให้ได้สารทุติยภูมิในกลุ่มฟีนอลิก ก็อาจสามารถหาสารใหม่ๆ ที่สามารถยับยั้ง
 การเจริญของเซลล์มะเร็งได้และเป็นพิษกับเซลล์ปกติน้อยที่สุด

จากผลการทดลองทั้งประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการยับยั้ง
 แบคทีเรีย และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งให้เห็นว่า ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา
 มีฤทธิ์สูงที่สุด ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ อาจเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในพืช
 เห็นได้จาก crude extracts ที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ
 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงด้วย และหากมีการ
 นำ crude extracts เหล่านี้ไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ก็อาจมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล
 อิสระ ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงขึ้นด้วย และ
 อาจให้ผลใกล้เคียงกับ gallic acid และ chloramphenicol ที่เป็นสารสังเคราะห์ได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. เอทานอล (Ethanol) เป็นตัวทำละลาย (Solvent) ที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม และรากต้นจันทน์หอม ส่วนเฮกเซน (Hexane) เป็นตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสมในการสกัด crude extracts เหล่านี้ เนื่องจากแทบจะไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเลย

2. Crude extracts จากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม รากต้นจันทน์หอม และการรวมตัวอย่างพืชมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ทั้งการจับกับอนุมูลอิสระ (Scavenging effect) การเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing power) และการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ (DNA protection)

3. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ทางตรงกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดย crude extracts จากเปลือกต้นเพกาที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด จะมีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (Scavenging effect) การเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing power) สูงที่สุดด้วย

4. Crude extracts จากเปลือกต้นเพกาสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก คือ *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* และแกรมลบ คือ *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ในขณะที่ crude extracts จากรากต้นกระถิน รากผักหนาม รากต้นจันทน์หอม และการรวมตัวอย่างพืชในระดับที่ใช้ในการทดลองสามารถยับยั้งได้เพียงแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. cereus*

5. Crude extracts จากเปลือกต้นเพกา รากต้นกระถิน รากผักหนาม รากต้นจันทน์หอม และการรวมตัวอย่างพืชมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยหากใช้ที่ความเข้มข้นต่ำๆ จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

บรรณานุกรม

- กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์. 2547. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Basic Tehnique in Animal Cell Culture). ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ชนศักดิ์ และคณะ. 2551. ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*). เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 538-545.
- ธีราพร ทัสพร. 2547. เพกาพืชใกล้ตัว. *อภัยภูเบศรสาร*. ปีที่ 2 ฉบับที่ 17. เดือนพฤศจิกายน.
- นงนภัศ ดวงดี. 2551. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant). โครงการเคมี. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- เปรมวดี สกุลสม. 2549. พืชต้านมะเร็งและกลไกการออกฤทธิ์. วิทยานิพนธ์ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พนิดา กุลประสูติติก. 2548. วิธีต้านอนุมูลอิสระในตัวคุณ: 64-72.
- พิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล. 2549. “Use of Plant Phenolic Compounds as Antioxidants (การใช้สารประกอบฟีนอลิกของพืชเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ).” *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*. ปีที่ 26. ฉบับที่ 3. เดือนกันยายน-ธันวาคม.
- วีรานุช หลาง. 2551. จุลชีววิทยา สิ่งแวดล้อม. สายวิชาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 4-6.
- ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ. 2549. ความปลอดภัยของอาหาร (FOOD SAFETY). ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข. คณะสัตวแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: 84-226.
- สิรินทร พลนอก. 2551. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาชีวภาพการแพทย์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สุนทรี สิงหนุตตรา. 2535. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด: 84-85.
- สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน. 2538. ผักพื้นบ้าน ความหมายและภูมิปัญญาของสามัญชนไทย. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. สถาบันการแพทย์แผนไทย. กรมการแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข: 52 77 81 104-105 180 และ 193.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. [Online]. ยาต้านจุลชีพ. Accessed 3 March 2553 Available from <http://elib.fda.moph.go.th/elib/cgi-bin/opacexe.exe?op=dsp&cat=sub&lang=>

1&db=jindex&pat=%C2%D2%B5%E9%D2%B9%A8%D8%C5%AA%D5%BE&cat=sub&skin=u&lpp=20&catop=&scid=zzz&bid=33955.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2538. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 2 (Queen Sirikit Botanic Garden Vol.2). สำนักนายกรัชมุนตรี: 133.

Al-Dabbas, M. M., Sukanuma, T., Kitahara, K., Xing Hou, D. and Fujii, M. 2006. Cytotoxic, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. Extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 108; 287–293.

Ao, C., Li, A., Elzaawely, A. A., Xuan, T. D. and Tawata, S. 2008. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. *Food Control* 19; 940–948.

Babu, K. S., Babu, T. H., Srinivas, P. V., Sastry, B. S., Kishore, K. H., Murthy, U. S. N. and Rao, J. M. 2005. Synthesis and in vitro study of novel 7-O-acyl derivatives of Oroxylin A as antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15; 3953–3956.

Babu, K. S., Babu, T. H., Srinivas, P. V., Kishore, K. H., Murthy, U. S. N. and Rao, J. M. 2006. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16; 221–224.

Bartosz, G. 2009. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?. *biochemical-pharmacology* 77; 1303–1315.

Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239; 70–76.

Borisutpeth, P., Kanbutra, P., Weerakhun, S., Sarachoo, K. and Portrakulpipat, S. 2005. Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plant Extracts on *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* Isolated from Diseased Tilapia (*Oreochromis niloticus*). 31st Congress on Science and Technology of Thailand. Suranaree University of Technology.

Coventry, D. R. and Dilworth, M. J. 1975. Inhibition of Protein Synthesis by D-three-chloramphenicol in the Laboratory and Nodule Forms of *Rhizobium Zupini*. *Journal of General Microbiology* 90; 69-75.

Costa-Lotufo, L. V., Hassan Khan, M. T., Ather, A., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., Pessoa, C., Amaral de Moraes, M. E. and Odorico de Moraes, M. 2005. Studies of the anticancer

- potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 99; 21–30.
- Earl, A. M., Losick, R. and Kolter, R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* 16 (6); 269 – 275.
- Flaus, A., Stockdale, C., Wilson, E. G., Engholm, M., Ferreira, H. and Hughes, T. O. 2006. Site-directed hydroxy radical mapping of nucleosome positions *in vitro* (PROT21). *The Epigenome Network of Excellence* 3.
- Gamal-Eldeen, A. M., Amer, H., Helmy, W. A., Talaat, R. M. and Ragab, H. 2007. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. *International Immunopharmacology* 7; 871–878.
- Herrero, M., Ibáñez, E., Señoráns, J. and Cifuentes, A. 2004. Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 1047; 195–203.
- Hu, H., Zhang, Z., Lei, Z., Yang, Y. and Sugiura, N. 2009. Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (1); 42–48.
- Kalaivani, T. and Mathew, L. 2009. Phytochemistry and Free radical scavenging activity of *Oroxylum indicum*. *Environ* 4; 45-52.
- Karthikumar, S., Vigneswari, K. and Jegatheesan, K. 2007. Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of *Eclipta prostrata* (L). *Scientific Research and Essay* 2 (4); 101-104.
- Kumar, G. S., Nayaka, H., Dharmesh, S. M. and Salimatha, P.V. 2006. Free and bound phenolic antioxidants in amla (*Embllica officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of Food Composition and Analysis* 19; 446–452.
- Laupattarakasem, P., Houghton, P. J., Hoult, J. R. S. and Itharat, A. 2003. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *Journal of Ethnopharmacology* 85; 207–215.

- Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I., Coganc, U., Said, O. and Saleh, K. A. 2005. Bomzon A., Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* 99; 43–47.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100; 1409–1418.
- Maisuthisakul, P., Pasuk, S. and Ritthiruangdej, P. 2008. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plant., *Journal of Food Composition and Analysis* 21; 229–240.
- Mohsen, S. M. and Ammar, A. S. M. 2009. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Corn Tassel Extracts. *Food Chemistry* 112; 595–598.
- Mokbel, M. S. and Hashinaga, F. 2005. Antibacterial and Antioxidant Activities of Banana (*Musa*, AAA cv. Cavendish) Fruits Peel. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1 (3); 125-131.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 26 (2); 211-219.
- Murakami, A., Jiwajinda, S., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. 1995. Screening for in vitro anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Letters* 95; 139-146.
- Ningappa, M. B., Dinesha, R. and Srinivas, L. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. *Food Chemistry* 106; 720–728.
- Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I. M., Coimbra, T. L. M., Gorin, P. A. J. and Sierakowski, M. R. 2003. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research* 60; 201–208.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical process* 19 (2).
- Pietta, P. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Product* 63; 1035-1042.
- Rahman, M. M. and Gray, A. I. 2005. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 66; 1601–1606.

- Rahman, M. M., Gibbons, S. and Gray, A. I. 2007. Isoflavanones from *Uraria picta* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 68; 1692–1697.
- Sakurazawa, T. and Ohkusa, T. 2005. Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cells. *Journal of Gastroenterol* 40; 600–609.
- Sareen, M. and Khuller, G. K. 1988. Phospholipids of ethambutol-susceptible and resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biosci.* 13; 243–248.
- Schuster, B. and Hemann, K. 1985. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in Soft Fruits. *Phytochemistry* 24; 2761.
- Thi Hong Van, N., Van Minh, C., Leo, M. D., Siciliano, T. and Braca, A. 2006. Secondary metabolites from *Lasia spinosa* (L.) Thw. (Araceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34; 882-884.
- Tran, Q. L., Tezuka, Y., Ueda, J. y., Nguyen, N. T., Maruyama, Y., Begum, K., Kim, H. S., Wataya, Y., Tran, Q. K. and Kadota, S. 2003. In vitro antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 86; 249–252.
- Wilson, C. M. 1996. Bacteria, Antibiotics and Amino Acid Incorporation into Maize Endosperm Protein Bodies. *Plant Physiol* 41; 325-327.
- Yen, G. C., Lai, H. H. and Chou, H. Y. 2001. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chemistry* 74; 471–478.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม Gallic acid

ละลาย gallic acid ใน 95% ethanol เล็กน้อย จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรตามต้องการ (เอทานอลเป็นพิษต่อเซลล์ ในกรณีทดสอบกับเซลล์ ต้องมีความเข้มข้นของ ethanol ไม่เกิน 1%)

2. สารละลาย 60 μM DPPH (เตรียมก่อนใช้งาน)

สารเคมี	ปริมาณ
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	0.0237 g

วิธีคำนวณ

DPPH มี M.W. เท่ากับ 394.33 g/mol

นั่นคือ 1M (mol/L) มี DPPH อยู่ 394.33 g/mol

$$\begin{array}{c|c|c|c} \text{ต้องการเตรียม } 60 \mu\text{M} \text{ ต้องชั่ง DPPH มา } 60 \mu\text{M} & 1 \text{ M} & 1 \text{ mol/L} & 394.33 \text{ g/mol} \\ \hline & 1 \times 10^{-6} \mu\text{M} & 1 \text{ M} & \\ \hline & = 0.0237 \text{ g/L} & & \end{array}$$

วิธีเตรียม

ชั่ง DPPH มา 0.0237 g ละลายใน 95% ethanol 1000 ml ในที่มืด (DPPH ละลายได้ยาก ควรใช้ magnetic bar กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน)

3. สารละลาย FRAP

ประกอบด้วย 300 mmol/L sodium acetate buffer pH 3.6

20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

10 mmol/L TPTZ ใน 40 mmol/L HCl

* ก่อนใช้งานจึงนำมาผสมในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v) และนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C

วิธีเตรียม

300 mmol/L Sodium acetate buffer pH 3.6

ละลาย sodium acetate 24.61 g ในน้ำกลั่น 850 ml แล้วปรับ pH ด้วย acetic acid จนได้ pH 3.6 จากนั้นปรับปริมาตรจนได้ 1000 ml

20 mmol/L FeCl₃·6H₂O

ละลาย ferric chloride 5.41 g ในน้ำกลั่น 1000 ml

40 mmol/L HCl

วิธีคำนวณ

HCl มี density เท่ากับ 1.191 kg/m³, ความเข้มข้น 36.5-38%, M.W. เท่ากับ 36.5

g/mol

$$\text{จากสูตร } M = \frac{10 (\%) D}{\text{M.W.}} = \frac{10 \times 37 \times 1.191}{36.5} = 12.07 \text{ mol/L}$$

ต้องการเตรียม 40 mmol/L HCl ปริมาตร 1000 ml

$$\text{จาก } C_1 V_1 = C_2 V_2 \longrightarrow (12.07 \text{ mol/L}) (V_1) = (0.04 \text{ mol/L}) (1000 \text{ ml})$$

$$V_1 = 3.31 \text{ ml}$$

นั่นคือ ดูด HCl มา 3.31 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml

10 mmol/L TPTZ

ชั่ง TPTZ มา 3.12 g ละลายใน 40 mmol/L HCl 1000 ml

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

4. สารละลาย 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.4

สารเคมี	ปริมาณ
Tris base	12.114 g
HCl	สำหรับปรับ pH

วิธีเตรียม

1. ชั่ง tris base 12.114 g ละลายในน้ำกลั่น 900 ml
2. นำไปปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml

5. สารละลาย Sodium carbonate (7.5%)

ชั่ง sodium carbonate มา 7.5 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml

6. สารละลาย Fenton's reagent

ประกอบด้วย	100 μM FeCl ₃ ·6H ₂ O
	100 μM Ascorbate
	1 mM H ₂ O ₂

104 μ M EDTA

* เนื่องจากสารละลายมีความเข้มข้นต่ำทำให้เตรียมได้ยาก ดังนั้น เตรียมแต่ละสารเป็น stock เก็บไว้ ก่อนใช้งานจึงนำมาเจือจาง

1 M FeCl₃·6H₂O

ชั่ง FeCl₃·6H₂O มา 2.7 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 ml

1 M Ascorbate

ชั่ง Ascorbic acid มา 1.98 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml (โดย 1 g Ascorbic acid เท่ากับ 1.1248 Sodium ascorbate)

1 M H₂O₂

ดูด H₂O₂ มา 1.02 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 ml

0.2 M EDTA

ชั่ง EDTA มา 0.5845 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml

7. สารละลาย TAE beffer

สารเคมี	ปริมาณ
Tris base	242 g
EDTA, sodium salt	18.6 g

วิธีเตรียม

1. ละลายสารในน้ำกลั่น 800 ml ผสมให้เข้ากัน
2. ปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH 8 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml เก็บที่

อุณหภูมิห้อง

8. การเตรียม 1% Agarose gel electrophoresis

ชั่ง agarose 0.3 g ลงใน TAE buffer 30 ml แล้วนำไปอุ่นในไมโครเวฟประมาณ 1 นาที ให้ agarose ละลาย จากนั้นเติม ethidium bromide 15 μ l แล้วเทลงบนพิมพ์ รอกันเจลแข็งตัว

9. Nutrient hard agar

สารเคมี	ปริมาณ
peptone	10 g
meat extract	5 g

sodium chloride	2.5 g
agar	10 g

วิธีเตรียม

1. ละลายสารเคมีทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 ml
2. นำไปปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 6.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C นาน 20 min

10. Nutrient broth

สารเคมี	ปริมาณ
Peptone	10 g
Meat extract	5 g
Sodium chloride	5 g

วิธีเตรียม

1. ละลายสารเคมีทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 ml
2. นำไปปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 6.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C นาน 20 min

11. Soft agar medium

สารเคมี	ปริมาณ
Peptone	10 g
Meat extract	5 g
Sodium chloride	2.5 g
Agar	4 g

วิธีเตรียม

1. ละลายสารเคมีทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 ml
2. นำไปปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 6.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C นาน 20 min

12. อาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM medium)

สารเคมี	ปริมาณ
อาหารผง (MEM)	1 ชอง
Sodium carbonate anhydrous (NaHCO ₃)	2.2 g
Fetal bovine serum	1 ขวด (100 ml)

วิธีเตรียม

1. ละลายอาหารผง 1 ชองและ NaHCO₃ 2.2 g ในน้ำ DI 850 ml
2. เติม fetal bovine serum 100 ml ที่ผ่านการ activate แล้ว (ใน water bath อุณหภูมิ 55°C นาน 30 min) ลงในสารละลายอาหาร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ปรับ pH ของสารละลายอาหารให้ได้ประมาณ 7.2 แล้วปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้เป็น 1000 ml
4. กรองสารละลายผ่าน 0.2 µm membrane filter ในตู้ปลอดเชื้อ (กรณีกรองแบบ negative pressure ควรปรับ pH ให้เป็นกรดเล็กน้อย ประมาณ 6.9-7.0 เนื่องจากหลังการกรอง pH ของอาหารจะสูงขึ้นประมาณ 0.1-0.3 unit) แล้วถ่ายสารละลายลงในขวดปลอดเชื้อ
5. แบ่งตัวอย่างสารละลายอาหารไป ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยปิเปตสารละลายอาหาร 1 ml ลงในหลอดบรรจุ tryptose phosphate soy broth 3 ml และ thioglycolate broth 3 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7 วัน
6. ปิดฝาขวดและพันพาราฟิล์มตรงรอยต่อของฝาขวด เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

13. สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS, Ca²⁺, Mg²⁺, Free)

สารเคมี	ปริมาณ
Sodium chloride (NaCl)	8.0 g
Potassium chloride (KCl)	0.2 g
Sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	1.25 g
Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.2 g

วิธีเตรียม

1. นำส่วนผสมทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ตามลำดับ
2. ปรับ pH ให้ได้ pH 7.4
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 121°C นาน 20 min หรือกรองผ่าน 0.2 µm membrane filter ในตู้ปลอดเชื้อ (กรณีมี Ca²⁺ และ Mg²⁺ เป็นองค์ประกอบ ควรใช้วิธีการกรอง)

4. เก็บสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิห้องหรือ 4°C

14. สารละลาย Trypsin/EDTA

สารเคมี	ปริมาณ
ทริปซิน	0.25 g
EDTA(Na ₂)	3.74 g
วิธีเตรียม	

1. ละลายทริปซิน (1:250) 0.25 g และ EDTA(Na₂) ในสารละลาย PBS (Ca²⁺, Mg²⁺, Free) 100 ml (ได้ 0.25% ทริปซินที่มี EDTA 1mM)

2. ปรับ pH ให้ได้ pH 7.4-7.6 แล้วกรองผ่าน 0.2 µm membrane filter ในตู้ปลอดเชื้อลงในขวดปลอดเชื้อ

3. ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยทำเช่นเดียวกับการตรวจสอบอาหาร

4. เก็บสารละลาย Trypsin/EDTA ที่อุณหภูมิ 4°C

15. สารละลาย MTT

1. ละลาย MTT ในสารละลาย PBS pH 7.4

2. กรองผ่าน 0.2 µm membrane filter ในตู้ปลอดเชื้อลงในขวดปลอดเชื้อ

3. เก็บที่อุณหภูมิ -20°C (เก็บได้ไม่เกิน 1 เดือน)

มหาวิทยาลัยศิลปากร ภาคผนวก ข สงวนลิขสิทธิ์

ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ

เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระมีเยอะมาก ในที่นี้จึงยกตัวอย่างการคำนวณเฉพาะ crude extracts จากเปลือกต้นเพกาที่ใช้ ethanol เป็น solvent

ตัวอย่างการหาประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (%Scavenging effect)

วิธีเตรียมสารสกัด

เตรียม crude extracts ความเข้มข้น 1000 µg/ml

ในการทดลองดูมา 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 0.1 ml

เพราะฉะนั้นมีเนื้อสาร 20, 40, 60, 80, 100 µg

เติม DPPH ไป 3.9 ml จึงมี final concentration = 4 ml

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ = 5, 10, 15, 20, 25 µg extract/ml DPPH

ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (%Scavenging effect) จะตรวจผลเมื่อปฏิกิริยาระหว่าง crude extracts กับ DPPH ดำเนินไปเป็นเวลา 30 นาที แต่สำหรับการหาค่า EC₅₀ จะตรวจผลเมื่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมเริ่มมีแนวโน้มคงที่ โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 210 นาที และค่าการดูดกลืนแสงของ crude extracts จากเปลือกต้นเพกาที่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย แสดงในตารางที่ 15, 17 และ 19

%Scavenging effect คำนวณได้จาก

$$\%Scavenging\ effect = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

เช่น ค่าการดูดกลืนแสง (517 nm) ของ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา ที่เวลา 30 นาที เท่ากับ 0.361 และค่าการดูดกลืนแสงของ control (ไม่มีการเติม crude extracts) เท่ากับ 0.440 (ได้จากการเฉลี่ยของ 0.438, 0.442 และ 0.441)

$$\%Scavenging\ effect = \frac{0.440 - 0.361}{0.440} \times 100 = 18.02\ %$$

ประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (%Scavenging effect) ของ crude extracts จากเปลือกต้นเพกาที่ใช้ ethanol เป็น solvent แสดงในตารางที่ 16, 18 และ 20

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1)

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ crude extracts (µg/ml)																	
	control			5			10			15			20			25		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
30	0.438	0.442	0.441	0.361	0.352	0.353	0.264	0.271	0.265	0.188	0.184	0.184	0.122	0.117	0.128	0.083	0.068	0.067
60	0.435	0.442	0.442	0.356	0.348	0.349	0.257	0.262	0.257	0.177	0.171	0.171	0.108	0.103	0.112	0.067	0.055	0.054
90	0.449	0.457	0.457	0.368	0.358	0.360	0.263	0.268	0.264	0.181	0.177	0.177	0.112	0.105	0.114	0.071	0.061	0.060
120	0.430	0.441	0.441	0.347	0.343	0.343	0.244	0.249	0.245	0.161	0.156	0.155	0.089	0.081	0.092	0.051	0.045	0.042
150	0.423	0.438	0.440	0.344	0.334	0.337	0.233	0.236	0.232	0.148	0.142	0.139	0.077	0.076	0.084	0.048	0.047	0.044
180	0.413	0.444	0.451	0.350	0.340	0.333	0.240	0.231	0.228	0.150	0.134	0.137	0.081	0.071	0.085	0.046	0.041	0.041
210	0.420	0.440	0.445	0.348	0.336	0.330	0.235	0.228	0.224	0.147	0.130	0.132	0.076	0.068	0.081	0.044	0.040	0.038

ตารางที่ 16 %Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1)

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของ crude extracts (µg/ml)														
	5			10			15			20			25		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
30	18.02	20.06	19.83	40.05	38.46	39.82	57.31	58.21	58.21	72.29	73.43	70.93	81.15	84.56	84.78
60	19.03	20.85	20.62	41.55	40.41	41.55	59.74	61.11	61.11	75.44	76.57	74.53	84.76	87.49	87.72
90	19.00	21.20	20.76	42.11	41.01	41.89	60.16	61.04	61.04	75.35	76.89	74.91	84.37	86.57	86.79
120	20.66	21.57	21.57	44.21	43.06	43.98	63.19	64.33	64.56	79.65	81.48	78.96	88.34	89.71	90.40
150	20.68	22.98	22.29	46.27	45.58	46.50	65.87	67.26	67.95	82.24	82.48	80.63	88.93	89.16	89.85
180	19.72	22.02	23.62	44.95	47.02	47.71	65.60	69.27	68.58	81.42	83.72	80.50	89.45	90.60	90.60
210	20.00	22.76	24.14	45.98	47.59	48.51	66.21	70.11	69.66	82.53	84.37	81.38	89.89	90.80	91.26

ตารางที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 2)

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)																				
	control						5			10			15			20			25		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
30	0.394	0.371	0.381	0.300	0.301	0.301	0.235	0.233	0.228	0.169	0.168	0.169	0.103	0.103	0.101	0.056	0.056	0.101	0.056	0.051	0.060
60	0.400	0.372	0.387	0.301	0.300	0.299	0.229	0.225	0.220	0.158	0.157	0.158	0.093	0.093	0.090	0.049	0.049	0.090	0.049	0.045	0.051
90	0.398	0.369	0.386	0.295	0.294	0.294	0.220	0.219	0.214	0.148	0.148	0.148	0.080	0.080	0.077	0.040	0.040	0.077	0.040	0.039	0.041
120	0.392	0.368	0.387	0.290	0.290	0.289	0.215	0.213	0.209	0.141	0.140	0.140	0.073	0.073	0.071	0.039	0.039	0.071	0.039	0.035	0.037
150	0.387	0.365	0.384	0.286	0.284	0.285	0.207	0.206	0.201	0.135	0.135	0.135	0.067	0.067	0.064	0.036	0.036	0.064	0.036	0.036	0.034
180	0.382	0.365	0.380	0.280	0.284	0.281	0.201	0.203	0.197	0.129	0.130	0.130	0.063	0.063	0.060	0.035	0.035	0.060	0.035	0.038	0.037
210	0.373	0.363	0.379	0.275	0.276	0.279	0.194	0.197	0.193	0.120	0.121	0.123	0.054	0.054	0.052	0.036	0.036	0.052	0.036	0.032	0.034

ตารางที่ 18 %Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 2)

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)																	
	5						10			15			20			25		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
30	21.47	21.20	21.20	38.48	39.01	40.31	55.76	56.02	56.02	73.04	73.04	73.04	73.04	73.04	73.56	85.34	86.65	84.29
60	22.09	22.35	22.61	40.72	41.76	43.05	59.10	59.36	59.10	75.93	75.93	75.93	76.96	76.96	76.70	87.32	88.35	86.80
90	23.24	23.50	23.50	42.76	43.02	44.32	61.49	61.49	61.49	79.18	79.18	79.18	79.44	79.44	79.97	89.59	89.85	89.33
120	24.15	24.15	24.41	43.77	44.29	45.34	63.12	63.38	62.60	80.91	80.91	80.91	80.91	80.91	81.43	89.80	90.85	90.32
150	24.47	25.00	24.74	45.33	45.60	46.92	64.35	64.35	64.08	82.31	82.31	82.31	82.31	82.31	83.10	90.49	90.49	91.02
180	25.47	24.40	25.20	46.50	45.96	47.56	65.66	65.39	65.13	83.23	83.23	83.23	83.76	83.76	84.03	90.68	89.88	90.15
210	26.01	25.74	24.93	47.80	47.00	48.07	67.71	67.44	66.91	85.47	85.47	85.47	86.01	86.01	86.01	90.31	91.39	90.85

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 3)

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)																	
	control			5			10			15			20			25		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
30	0.394	0.371	0.381	0.305	0.311	0.306	0.246	0.233	0.235	0.163	0.187	0.174	0.114	0.109	0.106	0.085	0.077	0.075
60	0.400	0.372	0.387	0.300	0.307	0.304	0.237	0.222	0.224	0.149	0.173	0.161	0.098	0.093	0.091	0.068	0.064	0.063
90	0.398	0.369	0.386	0.293	0.301	0.296	0.228	0.216	0.216	0.138	0.164	0.150	0.087	0.081	0.080	0.057	0.052	0.053
120	0.392	0.368	0.387	0.288	0.298	0.292	0.224	0.211	0.211	0.131	0.157	0.144	0.080	0.076	0.074	0.053	0.050	0.048
150	0.387	0.365	0.384	0.280	0.290	0.288	0.215	0.203	0.205	0.126	0.150	0.136	0.072	0.068	0.067	0.043	0.043	0.042
180	0.382	0.365	0.380	0.276	0.288	0.282	0.212	0.201	0.199	0.120	0.144	0.130	0.069	0.062	0.062	0.044	0.042	0.040
210	0.373	0.363	0.379	0.266	0.283	0.278	0.200	0.192	0.193	0.111	0.136	0.122	0.060	0.057	0.055	0.038	0.041	0.037

ตารางที่ 20 %Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 3)

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)														
	5			10			15			20			25		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
30	20.16	18.59	19.90	35.60	39.01	38.48	57.33	51.05	54.45	70.16	71.47	72.25	77.75	79.84	80.37
60	22.35	20.53	21.31	38.65	42.54	42.02	61.43	55.22	58.33	74.63	75.93	76.45	82.40	83.43	83.69
90	23.76	21.68	22.98	40.68	43.80	43.80	64.09	57.33	60.97	77.36	78.92	79.18	85.17	86.47	86.21
120	24.67	22.06	23.63	41.41	44.81	44.81	65.74	58.94	62.34	79.08	80.12	80.65	86.14	86.92	87.45
150	26.06	23.42	23.94	43.22	46.39	45.86	66.73	60.39	64.08	80.99	82.04	82.31	88.64	88.64	88.91
180	26.53	23.34	24.93	43.57	46.50	47.03	68.06	61.67	65.39	81.63	83.50	83.50	88.29	88.82	89.35
210	28.43	23.86	25.20	46.19	48.34	48.07	70.13	63.41	67.17	83.86	84.66	85.20	89.78	88.97	90.04

เฉลี่ยการสกัดทั้ง 3 ครั้ง

ตารางที่ 21 %Scavenging effect ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (ผลจากการสกัดทั้ง 3 ครั้ง)

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)				
	5	10	15	20	25
30	20.05	38.80	56.01	74.01	82.75
60	21.30	41.36	59.39	77.60	85.77
90	22.18	42.60	60.98	79.62	87.15
120	22.98	43.96	63.13	81.89	88.88
150	23.73	45.74	65.01	83.63	89.57
180	23.91	46.31	66.08	84.14	89.76
210	24.56	47.50	67.64	85.52	90.37

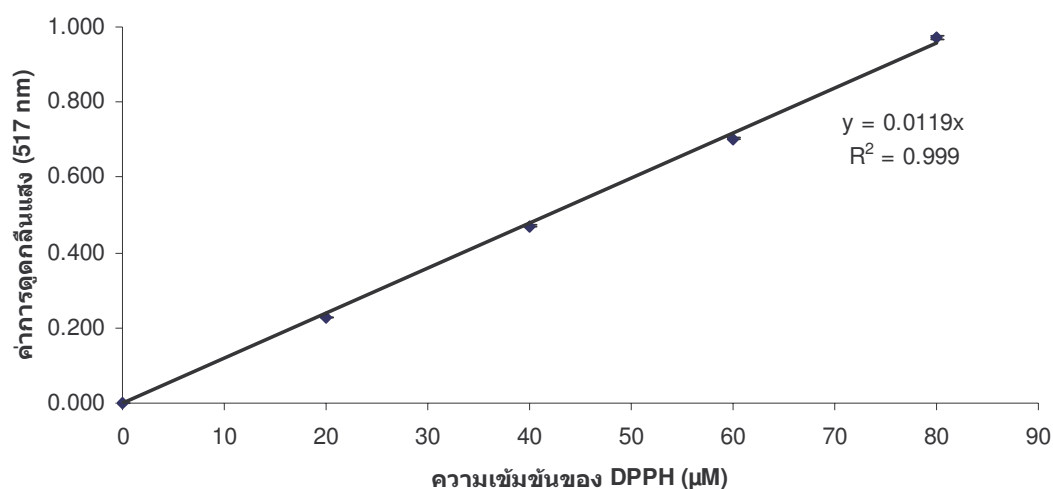
ค่าที่แสดงในตาราง ได้จากการทดลอง 9 ซ้ำ (n=9)

วิธีหาค่า EC_{50}

Standard DPPH

ตารางที่ 22 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 nm

ครั้งที่	ความเข้มข้นของ DPPH (μM)				
	20	40	60	80	100
1	0.229	0.475	0.701	0.976	1.052
2	0.226	0.470	0.704	0.966	1.052
3	0.226	0.469	0.705	0.970	1.053
เฉลี่ย	0.227	0.471	0.703	0.971	1.052



ภาพที่ 34 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ค่า EC_{50} หาได้จาก %Scavenging effect ของ crude extracts ที่เวลา 210 นาที โดยคิดเทียบจาก % DPPH ที่เหลือ โดย EC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของ crude extracts ที่สามารถลดปริมาณ DPPH ได้ 50%

เช่น ค่าการดูดกลืนแสงของ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1) และ control (ไม่มีการเติมสารสกัด) ที่เวลา 210 นาที แสดงในตารางที่ 23 ดังนี้

ตารางที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงของ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา ที่เวลา 210 นาที

เวลา (นาที)	Ab. control	ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)				
		5	10	15	20	25
210	0.435	0.338	0.229	0.136	0.075	0.041

จาก Standard DPPH $y = 0.0119x$

; $y =$ ค่าการดูดกลืนแสง

$x =$ ความเข้มข้น DPPH

$$x = y/0.0119$$

$$x = 0.435/0.0119$$

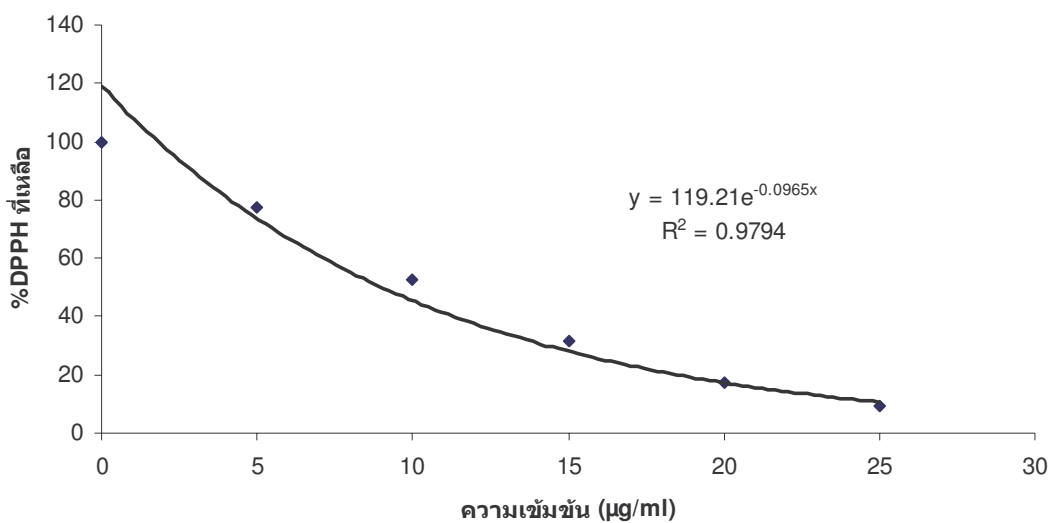
$$x = 36.55 \mu\text{M} \text{ เทียบเป็น } 100\%$$

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 24 %DPPH ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง 517 nm	DPPH ที่เหลือ (μM)	%DPPH ที่เหลือ
0	0.435	36.55	100
5	0.338	28.40	77.70
10	0.229	19.24	52.64
15	0.136	11.46	31.34
20	0.075	6.30	17.24
25	0.041	3.42	9.35

Plot กราฟระหว่าง %DPPH ที่เหลือ กับความเข้มข้นของ crude extracts เพื่อนำไปใช้หาค่า EC_{50} ดังนี้



ภาพที่ 35 %DPPH ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับ crude extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟทราบว่า $y = 119.21e^{-0.0965x}$ และ EC_{50} คือความเข้มข้นที่จับกับ DPPH ได้ 50%

เพราะฉะนั้นแทน y ในสมการเพื่อหาค่า x

$$y = 119.21e^{-0.0965x}$$

$$50 = 119.21e^{-0.0965x}$$

$$\ln 50 = \ln 119.21e^{-0.0965x}$$

$$3.912 = 4.781 - 0.0965x$$

$$x = (3.912 - 4.781) / (-0.0965)$$

$$x = (4.781 - 3.912) / 0.0965$$

$$x = 9.01$$

ดังนั้น ค่า EC_{50} ของ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา (สกัดครั้งที่ 1) มีค่าเท่ากับ

9.01 µg/ml DPPH

มหาวิทยาลัยศิลปากร ภาคผนวก ค สงวนลิขสิทธิ์

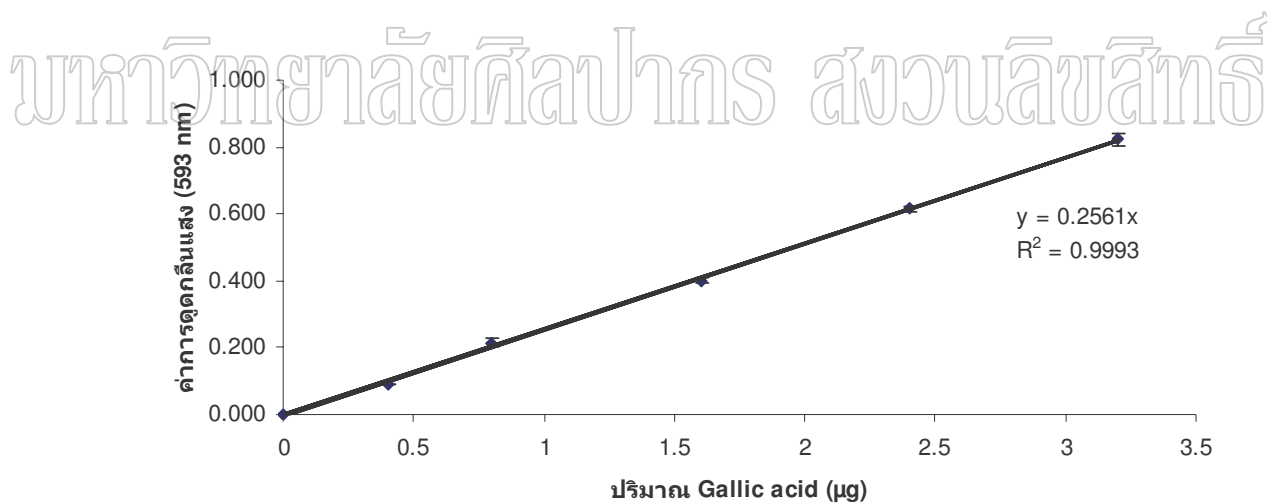
การหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์

Standard gallic acid

เตรียม gallic acid ความเข้มข้น 2, 4, 8, 12 และ 16 $\mu\text{g/ml}$ แต่ในการทดลองควมมาใช้ 0.2 ml เพราะฉะนั้นจึงมีเนื้อสาร 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 และ 3.2 ตามลำดับ และค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm แสดงในตารางที่ 25 ดังนี้

ตารางที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความยาวคลื่น 593 nm

ความเข้มข้น gallic acid ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง (593 nm)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
2	0.089	0.090	0.091	0.090
4	0.226	0.203	0.217	0.215
8	0.395	0.401	0.408	0.401
12	0.612	0.624	0.611	0.616
16	0.802	0.821	0.843	0.822



ภาพที่ 36 ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่างการหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์

ตารางที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts

crude extracts	ค่าการดูดกลืนแสง		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 1	0.616	0.633	0.638
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 2	0.634	0.615	0.636
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 3	0.643	0.625	0.626
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 1	0.510	0.519	0.542
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 2	0.505	0.491	0.484
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 3	0.597	0.572	0.587
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 1	0.565	0.588	0.573
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 2	0.582	0.533	0.531
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 3	0.580	0.568	0.568
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 1	0.548	0.559	0.564
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 2	0.563	0.555	0.566
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 3	0.521	0.523	0.533
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 1	0.504	0.504	0.511
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 2	0.406	0.404	0.398
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 3	0.454	0.459	0.468

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนวิจัยสัตว์

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ตอนทดสอบดูดมาใช้ 0.2 ml เพราะฉะนั้นจึงมี
เนื้อสาร 40 μg และจาก standard curve ของ gallic acid ทราบว่า $y = 0.2561x$

แทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เป็น y แล้วหาค่า x เช่น ค่าการดูดกลืนแสงของเปลือก
ต้นเพกา สกัดครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.616 นำไปแทนค่าในสมการ จะได้

$$x = y / 0.2561$$

$$x = 0.616 / 0.2561$$

$$x = 2.405$$

สารสกัด 40 μg มี antioxidant activity = 2.405 μg

ถ้าสารสกัด 1000 μg (1 mg) จะมี antioxidant activity = $(2.405 \times 1000) / 40$

$$= 60.13 \mu\text{g GAE/mg extract}$$

ตารางที่ 27 ความเป็น reducing power ของ ethanol extracts

สารสกัด [200 µg/ml]	µg GAE/ 40 µg extract	µg GAE/ mg extract	เฉลี่ย* mg GAE/g extract
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 1	2.456	61.40	61.46 ± 0.15
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 2	2.454	61.34	
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 3	2.465	61.63	
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 1	2.045	51.12	52.14 ± 4.58
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 2	1.926	48.16	
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 3	2.286	57.14	
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 1	2.247	56.16	55.19 ± 1.42
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 2	2.142	53.56	
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 3	2.234	55.84	
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 1	2.175	54.37	53.49 ± 1.90
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 2	2.192	54.80	
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 3	2.053	51.31	
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 1	1.977	49.43	44.56 ± 5.07
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 2	1.572	39.31	
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 3	1.798	44.94	

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=9)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร ภาคผนวก ๑ สงวนลิขสิทธิ์

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

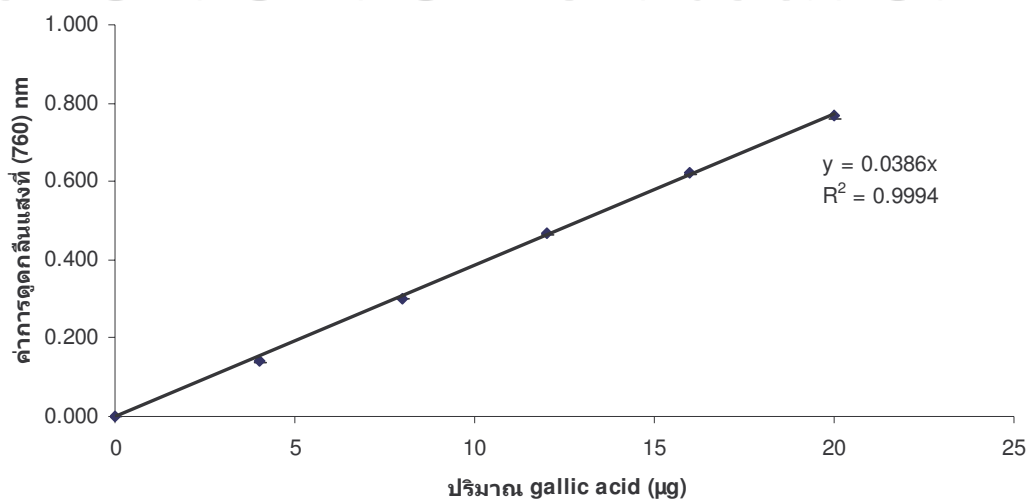
Standard gallic acid

เตรียม gallic acid ความเข้มข้น 8, 16, 24, 32 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ แต่ในการทดลองดูดมาใช้ 0.5 ml เพราะฉะนั้นจึงมีเนื้อสาร 4, 8, 12, 16 และ 20 ตามลำดับ และค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm แสดงในตารางที่ 28 ดังนี้

ตารางที่ 28 ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความยาวคลื่น 760 nm

ความเข้มข้น gallic acid ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง (760 nm)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
8	0.138	0.144	0.140	0.141
16	0.298	0.303	0.306	0.302
24	0.468	0.467	0.465	0.467
32	0.619	0.622	0.622	0.621
40	0.775	0.776	0.760	0.770

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



ภาพที่ 37 ค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตัวอย่างการหาปริมาณฟีนอลิก

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงของ ethanol extracts

crude extracts (200 µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 1	0.292	0.268	0.255
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 2	0.275	0.281	0.282
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 3	0.255	0.260	0.262
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 1	0.220	0.240	0.239
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 2	0.224	0.171	0.241
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 3	0.210	0.235	0.224
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 1	0.263	0.276	0.261
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 2	0.245	0.249	0.256
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 3	0.240	0.229	0.215
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 1	0.136	0.150	0.154
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 2	0.172	0.180	0.170
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 3	0.145	0.160	0.156
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 1	0.146	0.147	0.225
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 2	0.197	0.187	0.204
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 3	0.178	0.159	0.167

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 0.2 mg/ml ตอนทดลองดูมาใช้ 0.5 ml เพราะฉะนั้นมีเนื้อสาร 0.1 mg และจาก standard curve ของ gallic acid ทราบว่า $y = 0.0386x$

แทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เป็น y แล้วหาค่า x เช่น ค่าการดูดกลืนแสงของเปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.292 นำไปแทนค่าในสมการ จะได้

$$x = y / 0.0386$$

$$x = 0.292 / 0.0386$$

$$x = 7.565$$

สารสกัด 0.1 mg มี Total phenolic compound = 7.565 µg

ถ้าสารสกัด 1000 mg (1 g) จะมี Total phenolic compound = $(7.565 \times 1000) / 0.1$

$$= 75650 \mu\text{g GAE/g extract}$$

$$= 75.65 \text{ mg GAE/g extract}$$

ตารางที่ 30 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ ethanol extracts

สารสกัด [0.2 mg/ml]	mg GAE/ 0.1 mg extract	mg GAE/ g extract	เฉลี่ย* mg GAE/ g
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 1	7.038	70.38	69.95 ± 2.66
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 2	7.237	72.37	
เปลือกต้นเพกา สกัดครั้งที่ 3	6.710	67.10	
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 1	6.036	60.36	57.69 ± 2.72
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 2	5.492	54.92	
รากต้นกระถิน สกัดครั้งที่ 3	5.777	57.77	
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 1	6.908	69.08	64.31 ± 5.02
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 2	6.477	64.77	
รากผักหนาม สกัดครั้งที่ 3	5.907	59.07	
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 1	3.800	38.00	40.96 ± 3.68
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 2	4.508	45.08	
รากต้นขี้หนอน สกัดครั้งที่ 3	3.981	39.81	
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 1	4.473	44.73	46.34 ± 3.89
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 2	5.078	50.78	
การรวมตัวอย่างพืช สกัดครั้งที่ 3	4.352	43.52	

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=9)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร ภาคผนวก จ สงวนลิขสิทธิ์

วิธีเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เจียเชื้อแบคทีเรียจากหลอด ลงบนอาหารเหลวปริมาณ 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 h จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเจือจางด้วยอาหารเหลว ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm ก่อนนำไปทดสอบ เพื่อให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ในการทดสอบแต่ละครั้งมีความใกล้เคียงกันมากที่สุด

โดยค่าการดูดกลืนแสง 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm สามารถหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหน่วย Colony Forming Unit / ml (cfu/ml) ได้ดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/ml) ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 (600 nm)

แบคทีเรีย	CFU/ml (x 10 ⁸)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.90 ± 1.41
<i>Bacillus cereus</i>	2.66 ± 0.18
<i>Bacillus subtilis</i>	1.04 ± 0.09
<i>Salmonella enteritica serovar Enteritidis</i>	2.16 ± 0.55
<i>Salmonella enteritica serovar Typhimurium</i>	1.25 ± 0.12
<i>Escherichia coli</i>	2.35 ± 0.31

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=3)

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ สงวนลิขสิทธิ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร ภาคผนวก จ สงวนลิขสิทธิ์

ความเป็นพิษต่อเซลล์

เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มีเยอะมาก ในที่นี้จึงยกตัวอย่างการคำนวณเฉพาะ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา ที่ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง HeLa

ตัวอย่างการหา %ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa

ตารางที่ 32 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ HeLa ที่ทดสอบกับ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา

ความเข้มข้นของ crude extracts (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง (570 nm)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.05	0.298	0.282	0.248
0.1	0.245	0.273	0.247
0.2	0.260	0.213	0.248
0.4	0.166	0.188	0.160
0.8	0.059	0.066	0.072
1.2	0.055	0.058	0.056
1.6	0.046	0.046	0.047
2	0.051	0.050	0.050
control	0.316	0.308	0.303

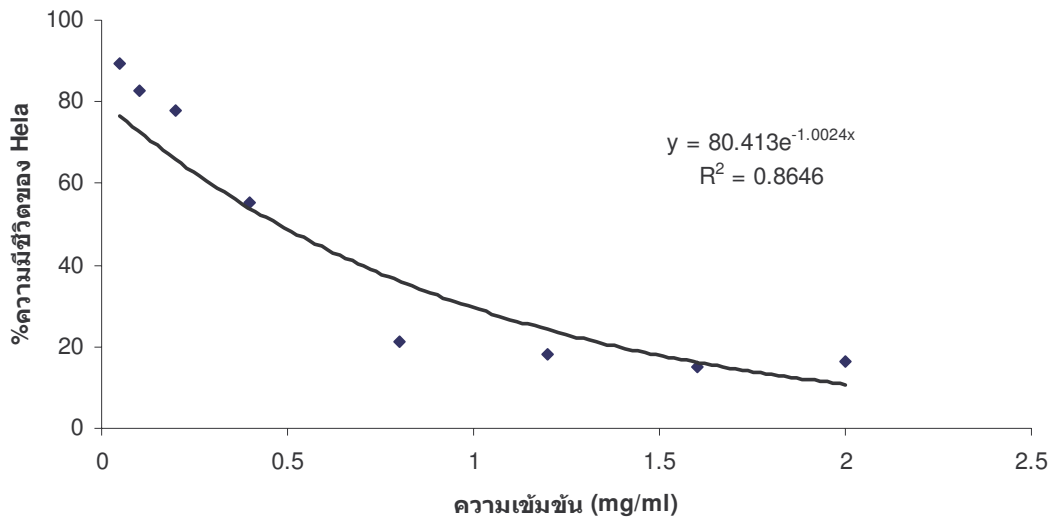
นำค่าการดูดกลืนแสงของ crude extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาเปรียบเทียบกับ control (ไม่มีการเติม crude extracts) โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของ control แทนความมีชีวิต 100% สามารถคำนวณหา %ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa ได้ดังตารางที่ 33 ดังนี้

ตารางที่ 33 %ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa ที่ทดสอบกับ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา

ความเข้มข้นของ crude extracts	ค่าการดูดกลืนแสง control	%ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.05	0.309	96.44	91.26	80.26	89.32
0.1	0.309	79.29	88.35	79.94	82.52
0.2	0.309	84.14	68.93	80.26	77.78
0.4	0.309	53.72	60.84	51.78	55.45
0.8	0.309	19.09	21.36	23.30	21.25
1.2	0.309	17.80	18.77	18.12	18.23
1.6	0.309	14.89	14.89	15.21	14.99
2	0.309	16.50	16.18	16.18	16.29

วิธีหาค่า IC_{50}

Plot กราฟระหว่าง %ความมีชีวิตของเซลล์ กับความเข้มข้นของ crude extracts ที่ใช้เพื่อนำไปหาค่า IC_{50} ดังนี้



ภาพที่ 38 %ความมีชีวิตของเซลล์ HeLa ที่ทดสอบกับ ethanol extracts จากเปลือกต้นเพกา

จากกราฟทราบว่า $y = 80.413e^{-1.0024x}$ และ IC_{50} คือความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเซลล์ได้ 50% เพราะฉะนั้นแทน y ในสมการเพื่อหาค่า x

$$y = 80.413e^{-1.0024x}$$

$$50 = 80.413e^{-1.0024x}$$

$$\ln 50 = \ln 80.413e^{-1.0024x}$$

$$3.912 = 4.387 - 1.0024x$$

$$x = (3.912 - 4.387) / (-1.0024)$$

$$x = (4.387 - 3.912) / 1.0024$$

$$x = 0.47386$$

ดังนั้น ค่า IC_{50} ของ crude extracts จากเปลือกต้นเพกาที่ทดสอบกับเซลล์ HeLa มีค่าเท่ากับ 0.47386 mg/ml หรือ 473.86 μ g/ml

ภาคผนวก ช

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ปริมาณ crude extracts ที่สกัดได้

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
PLANTS	1 เพกา	9
	2 กระถิน	9
	3 ผักหนาม	9
	4 ขี้หนอน	9
	5 รวม	9
SOLVENTS	1 ethanol	15
	2 hexane	15
	3 water	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: QUANTITY

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.310 ^a	14	.665	50.678	.000
Intercept	10.129	1	10.129	771.926	.000
PLANTS	.549	4	.137	10.465	.000
SOLVENTS	7.700	2	3.850	293.404	.000
PLANTS * SOLVENTS	1.061	8	.133	10.102	.000
Error	.394	30	.013		
Total	19.833	45			
Corrected Total	9.704	44			

a. R Squared = .959 (Adjusted R Squared = .940)

Post Hoc Tests

PLANTS

Homogeneous Subsets

QUANTITY

Duncan^{a,b}

PLANTS	N	Subset		
		1	2	3
ขี้หนอน	9	.2933		
รวม	9		.4456	
ผักหนาม	9		.4767	
กระถิน	9		.5244	.5244
เพกา	9			.6322
Sig.		1.000	.178	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .013.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.

SOLVENTS

Homogeneous Subsets

QUANTITY

Duncan^{a,b}

SOLVENTS	N	Subset		
		1	2	3
hexane	15	.1240		
ethanol	15		.2440	
water	15			1.0553
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .013.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

EC₅₀ ของ crude extracts

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
PLANTS	1	เพกา	9
	2	กระดังง์	9
	3	ผักหนาม	9
	4	ขี้เหล็ก	9
	5	รวม	9
	6	Gallic a	9
SOLVENTS	1	ethanol	18
	2	hexane	18
	3	water	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	96132.209 ^a	17	5654.836	116.944	.000
Intercept	54070.862	1	54070.862	1118.200	.000
PLANTS	11594.888	5	2318.978	47.957	.000
SOLVENTS	69188.312	2	34594.156	715.417	.000
PLANTS * SOLVENTS	15349.010	10	1534.901	31.742	.000
Error	1740.789	36	48.355		
Total	151943.861	54			
Corrected Total	97872.999	53			

a. R Squared = .982 (Adjusted R Squared = .974)

Post Hoc Tests

PLANTS

Homogeneous Subsets

EC50

Duncan ^{a,b}		Subset			
PLANTS	N	1	2	3	4
Gallic a	9	.4211			
เพกา	9		30.5000		
รวม	9		35.0222	35.0222	
กระถิน	9			38.8789	38.8789
ผักหนาม	9			40.0867	40.0867
ซีหนอน	9				44.9522
Sig.		1.000	.176	.153	.087

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 48.355.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.

SOLVENTS

Homogeneous Subsets

EC50

Duncan ^{a,b}		Subset		
SOLVENTS	N	1	2	3
hexane	18	.0000		
ethanol	18		13.2467	
water	18			81.6839
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 48.355.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = .05.

ความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งของ crude extracts

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
PLANTS	1	เพกา	9
	2	กระถิน	9
	3	ผักหนาม	9
	4	ซีหนอน	9
	5	รวม	9
SOLVENTS	1	ethanol	15
	2	hexane	15
	3	water	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: FRAP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	22626.865 ^a	14	1616.205	236.918	.000
Intercept	23641.063	1	23641.063	3465.521	.000
PLANTS	193.243	4	48.311	7.082	.000
SOLVENTS	22160.596	2	11080.298	1624.251	.000
PLANTS * SOLVENTS	273.026	8	34.128	5.003	.001
Error	204.654	30	6.822		
Total	46472.582	45			
Corrected Total	22831.518	44			

a. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .987)

Post Hoc Tests

PLANTS

Homogeneous Subsets

FRAP

Duncan^{a,b}

PLANTS	N	Subset		
		1	2	3
รวม	9	19.6944		
กระถิน	9	22.0033	22.0033	
ซีหนอน	9		23.2700	
ฝักหนาม	9		23.6133	23.6133
เพกา	9			26.0222
Sig.		.071	.227	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 6.822.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.

SOLVENTS

Homogeneous Subsets

FRAP

Duncan^{a,b}

SOLVENTS	N	Subset		
		1	2	3
hexane	15	1.1067		
water	15		14.2880	
ethanol	15			53.3673
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 6.822.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

ความสามารถในการเป็นตัววัดชี้ของ crude extracts จับคู่พืชแต่ละชนิด

Oneway

ANOVA

FRAP					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1094.688	15	72.979	57.490	.000
Within Groups	40.621	32	1.269		
Total	1135.309	47			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

FRAP

Duncan

PLANT	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
รวม	3	32.2467						
ผักหนาม	3		37.4233					
ผักหนาม+ซีหนอน	3			42.5300				
กระถิน+ผักหนาม	3			42.5633				
เพกา+กระถิน+ผักหนาม	3				44.7767			
เพกา+ผักหนาม	3				45.2967			
ซีหนอน	3				45.7167			
กระถิน+ผักหนาม+ซีหนอน	3				46.0467			
กระถิน	3				46.3033			
กระถิน+ซีหนอน	3				46.6633	46.6633		
เพกา+กระถิน+ผักหนาม	3					48.3900	48.3900	
ซีหนอน	3					48.4500	48.4500	
เพกา+กระถิน	3					48.4500	48.4500	
เพกา+กระถิน+ซีหนอน	3					49.0033	49.0033	
เพกา+ซีหนอน	3					49.2667	49.2667	
เพกา+ผักหนาม+ซีหนอน	3					49.7533	49.7533	
เพกา	3							51.9967
Sig.		1.000	1.000	.971	.079	.074	.196	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ crude extracts

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
PLANTS	1 เพกา	9
	2 กระถิน	9
	3 ผักหนาม	9
	4 ซีหนอน	9
	5 รวม	9
SOLVENTS	1 ethanol	15
	2 hexane	15
	3 water	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PHENOLIC

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	24996.478 ^a	14	1785.463	185.286	.000
Intercept	32470.517	1	32470.517	3369.625	.000
PLANTS	975.212	4	243.803	25.301	.000
SOLVENTS	22766.337	2	11383.168	1181.287	.000
PLANTS * SOLVENTS	1254.929	8	156.866	16.279	.000
Error	289.087	30	9.636		
Total	57756.082	45			
Corrected Total	25285.565	44			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .983)

Post Hoc Tests

PLANTS

Homogeneous Subsets

PHENOLIC

Duncan^{a,b}

PLANTS	N	Subset		
		1	2	3
ซีหนอน	9	21.5311		
รวม	9	23.1144	23.1144	
กระถิน	9		24.8689	
เพกา	9			31.8356
ผักหนาม	9			32.9600
Sig.		.288	.240	.448

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 9.636.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.

SOLVENTS

Homogeneous Subsets

PHENOLIC

Duncan^{a,b}

SOLVENTS	N	Subset		
		1	2	3
hexane	15	1.0247		
water	15		23.7120	
ethanol	15			55.8493
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 9.636.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

b. Alpha = .05.

ค่า IC₅₀ ของ ethanol extracts

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
PLANT	1	เพกา	6
	2	กระถิน	6
	3	ผักหนาม	6
	4	ขี้หนอน	6
	5	รวม	6
CELL	1	hela	15
	2	vero	15

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.953 ^a	9	.217	297.214	.000
Intercept	15.538	1	15.538	21284.39	.000
PLANT	1.599	4	.400	547.676	.000
CELL	.231	1	.231	315.840	.000
PLANT * CELL	.123	4	.031	42.096	.000
Error	.015	20	.001		
Total	17.505	30			
Corrected Total	1.967	29			

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .989)

Post Hoc Tests

PLANT

Homogeneous Subsets

IC50

Duncan ^{a,b}		Subset				
PLANT	N	1	2	3	4	5
ผักหนาม	6	.3967				
เพกา	6		.5200			
รวม	6			.7783		
กระถิน	6				.8767	
ขี้หนอน	6					1.0267
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = .05.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล	นางสาวสมฤทัย ทรัพย์เจริญพันธ์ Miss. Somrutai Supcharoenpun
วัน เดือน ปีเกิด	24 พฤศจิกายน 2527
ที่อยู่ปัจจุบัน	175 หมู่ 1 บ.นางัว ต.นางัว อ.น้ำโสม จ.อุดรธานี 41210 โทรศัพท์ 086-560 3957
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนน้ำโสมพิทยาคม อ.น้ำโสม จ.อุดรธานี
พ.ศ. 2549	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2550	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาตรี	วิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านทานอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากกะหล่ำปลีแดง
ระดับปริญญาโท	วิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรีย และการยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน
การนำเสนอผลงานทางวิชาการ	
Poster presentation	
พ.ศ. 2552	Antioxidants evaluation of crude extracts from traditional medicinal plants (Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology (TSB) ครั้งที่ 21)
พ.ศ. 2552	Effects of storage temperatures and lights on stability of antioxidant capacities in traditional medicinal plants (TSB ครั้งที่ 21)
Oral presentation	
พ.ศ. 2553	Antioxidant evaluation of crude extracts from bark of <i>Oroxylum indicum</i> (L.) Vent. (ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3)