การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคนา

จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(ดร.สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา)

.....กรรมการ

(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

.....กรรมการ

(ดร.ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์)

.....กรรมการ

(ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2559

ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.อนันต์ อธิพรชัย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนให้กำลังใจมาโดยตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่านที่ได้สั่งสอนให้ความรู้ทั้งทฤษฎี และปฏิบัติการทางเคมี รวมทั้งปลูกฝังให้เป็นครูวิทยาศาสตร์ที่ดี และมีคุณภาพ

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อถนัด น้อยแสง และคุณแม่จันทนา น้อยแสง และสมาชิกในครอบครัวทุกคน รวมทั้งเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาวิชาเคมีศึกษา ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ

56920125: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: แคนา/ พฤกษเคมี/ สารต้านอนุมูลอิสระ/ เอนไซม์ลิพอกซิเดส

จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ: การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคนา (PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *DOLICHANDRONE SERRULATA*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อนันต์ อธิพรชัย, Ph.D., 81 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา (*Dolichandrone serrulata*) ทั้งหมด 5 ส่วน ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด จากการศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา พบสารพฤกษเคมี คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ นอกจากนี้ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (9.27 ± 1.95 ถึง 63.38 ± 2.00 mgGAE.g^{-1}) ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (2.66 ± 0.05 ถึง 33.06 ± 2.28 mgQE.g^{-1}) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (203.85 ± 7.25 ถึง 940.39 ± 26.46 mgAE.g^{-1}) และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่าที่ความเข้มข้น 500.00 µg/mL สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนามีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 98.60 ± 1.23% รองลงมาคือ กิ่ง (82.75 ± 1.71%) ฝัก (56.24 ± 2.04%) เมล็ด (44.10 ± 3.23%) และดอก (42.48 ± 3.35%) จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา โดยใช้กรดลิโนเลอิกเป็นซับสเตรท พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL สารสกัดหยาบเอทานอลของใบแคนาสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสได้มากที่สุดเท่ากับ 97.19 ± 0.63% รองลงมาคือ กิ่ง (95.42 ± 0.43%) เมล็ด (85.34 ± 0.20) ฝัก (82.17 ± 0.13%) และดอก (38.39 ± 0.26%) จากผลการทดลองข้างต้นสารสกัดหยาบเอทานอลของทุกส่วนสกัดยกเว้นสารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกแคนามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสมากกว่าสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (50.29 ± 1.01%) จากผลข้างต้นพบว่าสามารถนำส่วนต่าง ๆ ของแคนามาพัฒนาและใช้ประโยชน์ทางด้านยาหรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ต่อไปอีกด้วย

56920125: MAJOR: CHEMISTRY EDUCATION; M.Sc. (CHEMISTRY EDUCATION)
KEYWORDS: *DOLICHANDRONE SERRULATA*/ PHYTOCHEMICAL SCREENING/ ANTIOXIDANT/ LIPOXIDASE

JUTARAT SREEPRASERT: PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *DOLICHANDRONE SERRULATA*. ADVISORY COMMITTEE: ANAN ATHIPORNCHAI, Ph.D. 81 P. 2016.

The present study was performed to evaluate the phytochemical screening and biological activities of the ethanolic extracts from five parts of *Dolichandrone serrulata* such as flowers, leaves, twigs pods and seeds. Phytochemical studies of the ethanolic extracts from this plant revealed that the presence of secondary metabolites of flavonoids, coumarins, saponins, tannins, terpenoids, steroids and cardiac glycoside. The extracts were used to determine total phenolic content (9.27 ± 1.95 to 63.38 ± 2.00 mgGAE.g^{-1}), total flavonoids content (2.66 ± 0.05 to 33.06 ± 2.28 mgQE.g^{-1}) and total antioxidant capacity (203.85 ± 7.25 to 940.39 ± 26.46 mgAE.g^{-1}). The highest antioxidant activity at 500.00 µg/mL using DPPH free radical scavenging method was demonstrated by *D. serrulata* leaves extract 98.60 ± 1.23% followed by twigs (82.75 ± 1.71%), pods (56.24 ± 2.04%), seeds (44.10 ± 3.23%) and flowers (42.48 ± 3.35%), respectively. In addition, the ethanolic extracts of several parts from *D. serrulata* were evaluated for anti-lipoxidase activity using linoleic acid as a substrate. The highest anti-lipoxidase activity at 1.00 mg/mL was demonstrated by *D. serrulata* leaves extract 97.19 ± 0.63% followed by twigs (95.42 ± 0.43%), seeds (85.34 ± 0.20), pods (82.17 ± 0.13%) and flowers (38.39 ± 0.26%), respectively. From these results, all extracts except the ethanolic extract of flower showed more active than quercetin (50.29 ± 1.01%) as the standard drug. Fortunately, these results suggest the potential of *D. serrulata* as medicine or cosmetic agents against free-radical-associated oxidative damage.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย..... 3

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของแคนา..... 4

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร..... 5

2.3 สารพฤกษเคมี..... 7

2.4 อนุมูลอิสระ..... 12

2.5 เอนไซม์ลิพอกซิเดส..... 15

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 16

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 21

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี..... 21

3.2 แผนการดำเนินการวิจัย..... 23

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 24

4 ผลการทดลองและอภิปรายผล..... 29

4.1 การสกัดสารจากแคนา..... 29

4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 30

4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม..... 31

4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม..... 33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม	35
4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging	36
4.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส	39
5 สรุปผลการวิจัย	43
5.1 สรุปผลการวิจัย	43
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	47
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข	53
ภาคผนวก ค	58
ภาคผนวก ง	63
ภาคผนวก จ	72
ประวัติย่อของผู้วิจัย	81

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากพืชชนิดต่าง ๆ ... 17

2-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของ Cyclohexylethanoid (**9**)
ด้วยวิธี ethyl phenylpropiolate (EPP)-induce ear edema in rats..... 19

2-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของ Cyclohexylethanoid (**9**)
ด้วยวิธี ethyl phenylpropiolate (EPP)-induce ear edema in rats (ต่อ)..... 20

4-1 น้ำหนักตัวอย่างพืช น้ำหนักสารสกัด ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพ
ของสารสกัดหยาบเอทานอลของแคนา..... 30

4-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ
ของแคนา..... 31

4-3 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ของสารมาตรฐาน
กรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 37

4-4 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ของ
สารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา..... 38

4-5 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและ
สารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนดอก ใบ และกิ่งของแคนาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 40

4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและ
สารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนฝัก และเมล็ดของแคนาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 41

ก-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)..... 50

ก-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา.... 52

ก-3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ
ของแคนา..... 52

ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)..... 55

ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา.... 57

ข-3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ
ของแคนา..... 57

ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)..... 60

ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา.... 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค-3 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา..... 62

ง-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)..... 65

ง-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)..... 66

ง-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)..... 67

ง-4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน..... 68

ง-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกแคนา..... 69

ง-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนา..... 69

ง-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากกิ่งแคนา..... 70

ง-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากฝักแคนา..... 70

ง-9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดแคนา..... 71

จ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)..... 75

จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกแคนา..... 76

จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนา..... 77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

จ-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากกิ่งแคนา..... 78

จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากฝักแคนา..... 79

จ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดแคนา..... 80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแคนา	5
2-2	ตัวอย่างของสารกลุ่มแอลคาลอยด์	8
2-3	ตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์	8
2-4	ตัวอย่างของสารกลุ่มแอนทราควิโนน	9
2-5	ตัวอย่างของสารกลุ่มคูมาริน	9
2-6	ตัวอย่างของสารกลุ่มซาโปนิน	10
2-7	ตัวอย่างของสารกลุ่มแทนนิน	10
2-8	ตัวอย่างของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์	11
2-9	ตัวอย่างของสารกลุ่มสเตียรอยด์	11
2-10	ตัวอย่างของสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์	12
2-11	ปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH	15
2-12	ขั้นตอนการสังเคราะห์สารที่ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบ	16
2-13	โครงสร้างของสาร phenolic triglycoside ที่แยกได้จากกิ่งแคนา	18
2-14	โครงสร้างของ Cyclohexylethanoid และ sitosterol-3-*O*-β-D-glucoside	19
3-1	แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย	23
4-1	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา	29
4-2	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก	32
4-3	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของแคนา	33
4-4	กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน	34
4-5	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของแคนา	34
4-6	กราฟมาตรฐานวิตามินซี	35
4-7	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของแคนา	36
4-8	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-9 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา..... 39

4-10 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา..... 42

ก-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก..... 50

ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน..... 55

ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานวิตามินซี..... 60

ง-1 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน..... 68

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การอักเสบ (Inflammation) เป็นอาการที่พบบ่อย และก่อให้เกิดความทุกข์ทรมานแก่ผู้ป่วยมาก โดยการอักเสบเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในร่างกายเพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอม หรือสิ่งที่เข้ามาทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ นอกจากนี้ยังช่วยกำจัดเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหรือตายจากการเข้ามาของสิ่งแปลกปลอมด้วย ซึ่งอาการพื้นฐานที่บ่งบอกถึงการอักเสบคือ ปวด บวม แดง ร้อน และทำให้อวัยวะหรือระบบนั้นสูญเสียการทำงานไป (วิรัตน์ นิวัฒนนันท์, กนกพร นิวัฒนนันท์, สุนีย์ จันทร์สกาว และวรรณดี แต้โสตถิกุล, 2547) แต่ถ้าหากไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นร่างกายจะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการบาดเจ็บและไม่มีการซ่อมแซม ส่งผลให้การทำงานของเนื้อเยื่อนั้น ๆ ผิดปกติไป อย่างไรก็ตาม กระบวนการอักเสบก็มีผลเสียเกิดขึ้นได้เช่นกัน หากเกิดการอักเสบมากเกินไป หรือเกิดการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นเวลานานจะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อนั้นผิดปกติได้

ปัจจุบันมีการวิจัยค้นคว้าพืชสมุนไพรต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ในรูปของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์มาใช้ในการต้านการอักเสบ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบต่าง ๆ (ผกากรอง ทองดียิ่ง, ศุณิตา มากชูชิต, สุมาลี ปานทอง, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อิฐรัตน์, 2555) เช่น เอนไซม์ลิพอกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่ผลิตสารที่ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบจากกรดอะราชิโดนิก (Arachidonic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่สร้างขึ้นมาจากฟอสโฟลิพิดที่อยู่ในผนังเซลล์ นอกจากนี้เอนไซม์ลิพอกซิเดสยังเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเกิดเป็นอนุมูลอิสระของกรดไขมันได้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสจึงเป็นผลให้ผลิตสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น Leukotriene และ Lipoxin ลดน้อยลง และยังเป็นการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอีกด้วย จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระได้

ดังนั้นการศึกษาสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ จึงน่าจะช่วยในการรักษา ป้องกันและดูแลสุขภาพของคนเราได้ ซึ่งสมุนไพรของไทยนั้นมีอยู่หลายชนิดที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ เช่น “แคนา” (*Dolichandrone serrulata*) มีรายงานสรรพคุณต่าง ๆ ที่ใช้ในตำรายาโบราณ เช่น แก้ท้องร่วง ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้โรคชัก บำรุงโลหิต และที่สำคัญคือใช้แก้บวมอักเสบ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553) จากเหตุผลที่

กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาแคนาให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด

2. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด

3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เตรียมสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

2. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่างๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด แบ่งการทดสอบเป็น 9 กลุ่ม คือ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

3. หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด

4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักและเมล็ด

2. ทำให้ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด

3. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด

4. เพื่อเป็นข้อมูลที่จะนำส่วนต่าง ๆ ของแคนา ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ดไปใช้ประโยชน์และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางยาต่อไป

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สมุนไพร หมายถึง ผลิตผลธรรมชาติได้จากพืช สัตว์และแร่ธาตุที่ใช้เป็นยา หรือผสมกับสารอื่นตามตำรับยาเพื่อบำบัดโรค บำรุงร่างกาย หรือใช้เป็นยาพิษ ถ้าเป็นสมุนไพรที่ได้มาจากพืช เรียกพืชนั้นว่า พืชสมุนไพร (Medicinal plant)

2. สารสกัดหยาบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรงหรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะนำมาไปใช้ประโยชน์

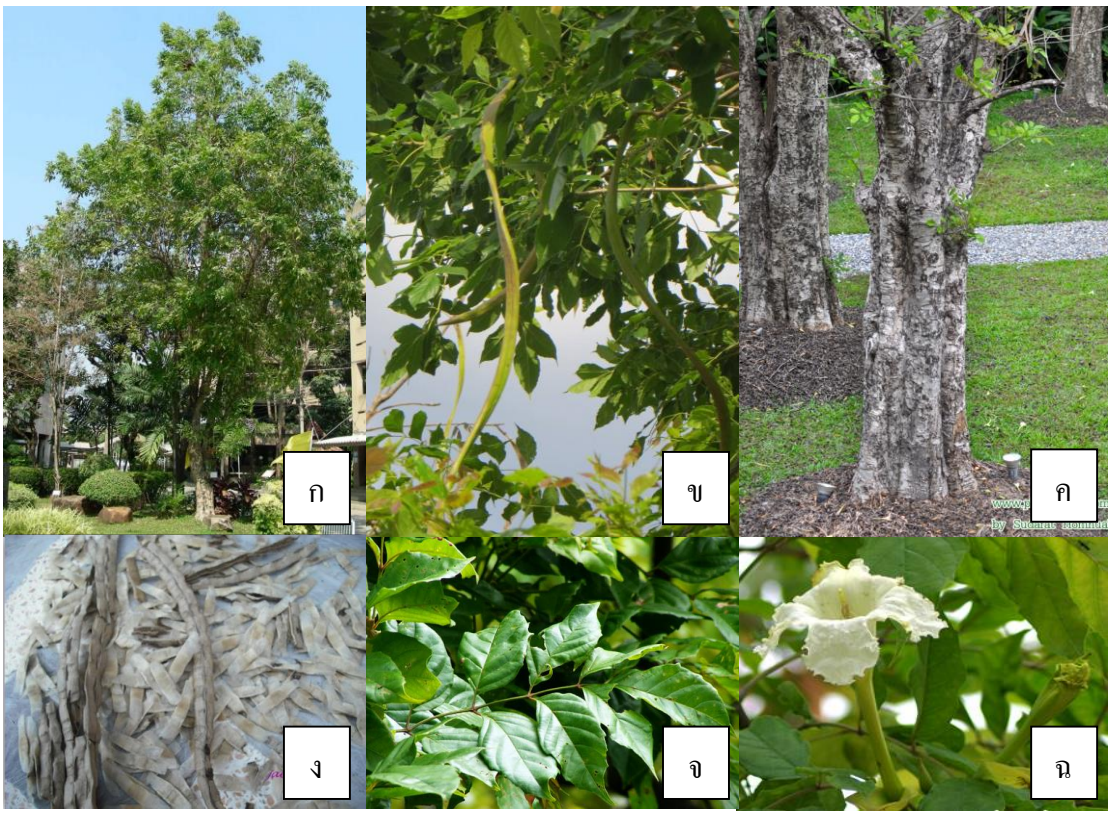
3. องค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดในพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นว่ามีสารเคมีกลุ่มใดบ้างที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เป็นวิธีที่ง่าย เร็ว และค่อนข้างจำเพาะกับกลุ่มสารเคมี โดยตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสี (Color reaction) ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่าง ๆ หรือเกิดตะกอน แบ่งเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

4. ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) คือ ปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือสมบัติทางชีวภาพที่เกิดขึ้นและเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของแคนา (*Dolichandrone serrulata*)

แคนา เป็นไม้ต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูงได้ถึง 10-20 เมตร ลำต้นตรง แตกกิ่งต่ำผลัดใบ เรือนยอดเป็นพุ่มรูปไข่ ค่อนข้างทึบ ดอก เป็นดอกช่อแบบช่อกระจะสั้น ดอกใหญ่ รูปแตร สีขาว ออกตามปลายกิ่ง ยาว 2-3 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 1.8-4 เซนติเมตร แต่ละช่อมี 2-10 ดอก กลิ่นหอมบานตอนกลางคืนและร่วงตอนรุ่งเช้า กลีบเลี้ยงหนาและเหนียว ปลายเรียวเล็กโค้งยาว 3-4 เซนติเมตร จะหุ้มดอกตูมมิด เชื่อมติดกันเป็นหลอดโค้งปลายแหลม เมื่อดอกบานจึงมีรอยแตกทางด้านล่าง มีลักษณะเป็นกาบหุ้มกลีบดอก ติดกันเป็นท่อ ปลายขยายออกเป็นรูประฆัง และแยกออกเป็น 5 แฉก เกสรเพศผู้ 4 อัน ติดอยู่ด้านในของท่อกลีบดอก ปลายแยกมีขนาดสั้น 2 อัน ยาว 2 อัน และมีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 1 อัน รูปร่างเป็นเส้นเรียวเล็กรูปเส้นด้าย ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร อับเรณูยาวประมาณ 1 เซนติเมตร สีเทาดำ จานฐานดอกรูปเบาะ เป็นพูตื้น เกสรเพศเมีย 1 อัน ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียว ปลายคี่ ออกตรงข้าม 3-5 คู่ รูปไข่แกมขอบขนาน ปลายแหลม โคนใบเบี้ยว กว้าง 2.5-7 เซนติเมตร ยาว 6-16 เซนติเมตร ขอบใบหยักแบบซี่ฟัน ผิวใบด้านล่างมีขนสั้นประปรายบนก้านใบ ผลเป็นฝัก ช่อละ 3-4 ฝัก ฝักมีลักษณะแบน รูปขอบขนาน โค้ง บิดเป็นเกลียว ยาว 40-60 เซนติเมตร เมล็ด รูปสี่เหลี่ยม มีปีกใส เปลือกมีสีน้ำตาลอมเทาและมีประสีดำ เรียบแตกเป็นสะเก็ดโคนต้นเป็นพูเล็กน้อย แคนามีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีเขตการกระจายพันธุ์ในพม่า ลาว เวียดนาม และพบทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออกของไทย ขึ้นตามป่าเบญจพรรณและท้องนา สรรพคุณตำรายาไทย ดอกมีรสหวานเย็น ใช้ขับเสมหะ โลหิต และขับผายลม ใบ มีรสเย็น ใช้ตำพอกแผล หรือต้มน้ำบ้วนปาก เมล็ด มีรสหวานเย็น แก้อาการปวดประสาท แก้โรคชัก เปลือก มีรสหวานเย็น แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ใช้กับสตรีหลังคลอด แก้การอักเสบ ราก มีรสหวานเย็น ขับเสมหะและลม บำรุงโลหิต (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแคนา: (ก) ต้นแคนา (ข) ฝัก (ค) ลำต้น (ง) เมล็ด (จ) ใบ (ฉ) ดอก
(http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=28)

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญซึ่งต้องคำนึงถึงสิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช โดยมีการตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง เพื่อให้ได้ชื่อพฤกษศาสตร์และได้ตัวอย่างที่ถูกต้อง จะต้องไม่มีพืชอื่นปน ไม่มีโรคพืช เพราะจุลินทรีย์อาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการชีวสังเคราะห์ สถานที่ในการปลูก ระยะเวลาในการเก็บมีผลต่อปริมาณสาร จึงต้องบันทึกสถานที่ ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง นอกจากนี้การเก็บรักษาตัวอย่างทั้งแบบพืชสดและแห้งก็จะทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชแตกต่างกันได้ (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2544)

2.2.2 วิธีการสกัด

การสกัดสารสำคัญจากพืชทำได้หลายวิธี เช่น การหมัก (Maceration) การหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation) การสกัดด้วย Soxhlet extractor การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil) ซึ่งการเลือกใช้แต่ละวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารที่ทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันไป (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2544)

1. การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ ถังสแตนเลส เป็นต้น ทิ้งไว้หมั่นเขย่าและคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยรินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกมาจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด นำสารสกัดที่ได้ไปกรอง ถ้าต้องการสกัดให้หมดจะต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วค่อย ๆ บรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (Solvent head) ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกัน แล้วนำไปกรอง

3. การสกัดด้วย Soxhlet extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหย ขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับ สารสกัดจะไหลกลับลงไปใน Flask ด้วยวิธีการกาลักน้ำ Flask นี้เมื่อได้รับความร้อนจาก Heating mantle หรือหม้ออังน้ำ ตัวทำละลายจะระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ใน Flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบกับ Condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเช่นนี้เรื่อย ๆ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วย จึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัวไป

2.2.3 การเลือกตัวทำละลาย

ในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ คือ สารละลายและตัวทำละลายมีสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน ซึ่งตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติ เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด แต่ต้องละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (Selectivity) ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ มีความคงตัว และจะต้องหาง่าย ราคาถูกด้วย (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

2.2.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี ดังนี้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

1. การระเหย (Free evaporation) คือการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังน้ำ (Water bath) หรือ Hotplate หรืออาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

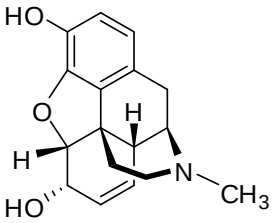
2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuum) เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ Vacuum pump เครื่องนี้เรียกว่า Rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ Distillation flask, Condenser และ Receiving flask ซึ่ง Distillation flask จะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงสม่ำเสมอ เครื่องมือที่ดีจะต้องมีระบบทำสุญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง Distillation flask และ Condenser สั้นและมีระบบทำความเย็นที่ดี

3. การแช่แข็ง (Freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำ วิธีที่เหมาะสมคือใช้วิธีแช่แข็งโดยใช้ Lyophilizer หรือ Freeze dry แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งแยกจาก Concentrated extract โดย Centrifuge วิธีนี้มีข้อดีเหมาะสมกับสารที่สลายตัวง่ายด้วยความร้อน

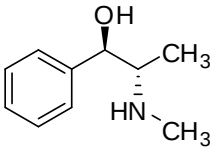
2.3 สารพฤกษเคมี

สารพฤกษเคมี (Phytochemical) เป็นสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบในพืช ซึ่งจะพบสารเป็นจำนวนมากในพืช สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้น (Biosynthetic origin) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ซึ่งสารปฐมภูมิ เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงโดยทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและกระบวนสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช สารเหล่านี้มักจะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน ดังนี้ (วันดี กฤษณพันธ์, 2544)

2.3.1 แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง พบมากในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ คุณสมบัติของแอลคาลอยด์ คือ รสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ มีคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมากมาย เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ตัวอย่างเช่น Morphine และ Cocaine ดังภาพที่ 2-2



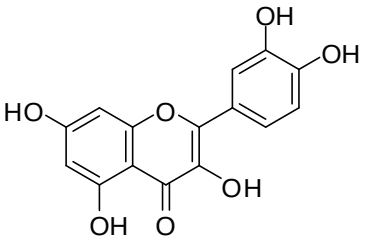
Morphine



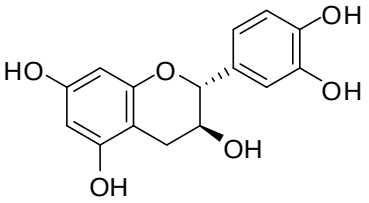
Cocaine

ภาพที่ 2-2 ตัวอย่างของสารกลุ่มแอลคาลอยด์

2.3.2 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นสารประกอบพอลิฟีนอลิก (Polyphenolic compound) พบมากในธรรมชาติโดยมักพบเป็นเม็ดสี (Pigment) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ส่วนใหญ่เป็นเม็ดสีที่ละลายได้ในน้ำ ทำให้ดอกไม้มีสีสวยงาม ในธรรมชาติจะพบฟลาโวนอยด์ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ อาจเรียกว่า ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส ตัวอย่างเช่น Quercetin และ Catechin ดังภาพที่ 2-3



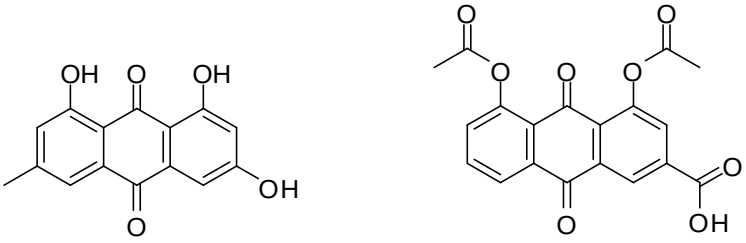
Quercetin



Catechin

ภาพที่ 2-3 ตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

2.3.3 แอนทราควิโนน (Anthraquinones) เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุด และมีความสำคัญที่สุด พบได้ทั้งในรูปอิสระ และไกลโคไซด์ แอนทราควิโนนมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3-ring system เป็นสารที่มีสีแดงส้ม มีการนำสารแอนทราควิโนนมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบายและยาถ่ายอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น Emodin และ Diacerein ดังภาพที่ 2-4



Emodin Diacerein

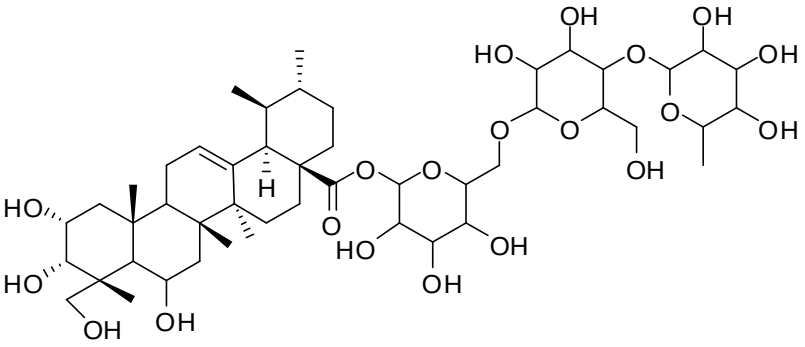
ภาพที่ 2-4 ตัวอย่างของสารกลุ่มแอนทราควิโนน

2.3.4 คูมาริน (Coumarins) สารจำพวกคูมาริน เป็นแลคโทนของ Ortho-hydroxy cinnamic acid ในพืชจะพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ สารในกลุ่มนี้อาจเรียกว่า คูมารินไกลโคไซด์ (Coumarins glycosides) หรือแลคโทนไกลโคไซด์ (Lactone glycosides) สารจำพวกคูมารินใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น เป็นยาบำรุงเลือด ตัวอย่างเช่น Aesculetin และ Umbelliferone ดังภาพที่ 2-5

Aesculetin Umbelliferone

ภาพที่ 2-5 ตัวอย่างของสารกลุ่มคูมาริน

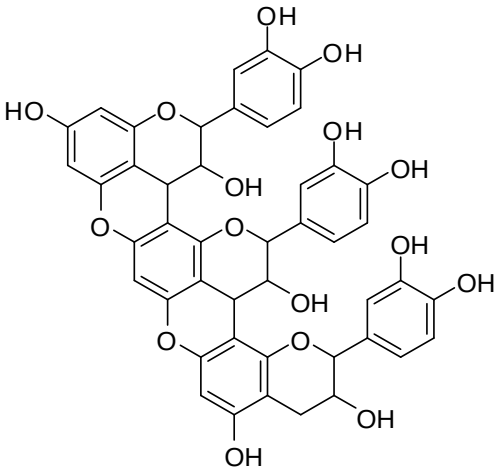
2.3.5 ซาโปนิน (Saponins) หรือซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่มีส่วน Aglycone เป็นสาร Steroids หรือ Triterpenoids ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C_3 ได้เป็น O-glycoside น้ำตาลที่พบส่วนใหญ่เป็น Oligosaccharide 1 – 5 หน่วย ซาโปนินไกลโคไซด์มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิว (Surface active agent) ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ เป็นยาฝาด ทำให้แผลหายเร็ว รักษาแผลไหม้ น้ำร้อนลวก ตัวอย่างเช่น Madecassoside ดังภาพที่ 2-6



Madecassoside

ภาพที่ 2-6 ตัวอย่างของสารกลุ่มซาโปนิน

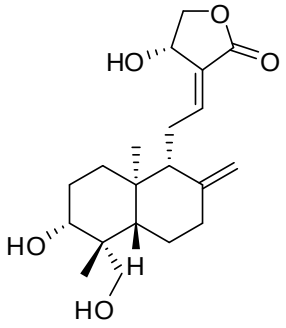
2.3.6 แทนนิน (Tannins) เป็นสารจำพวกพอลิฟีนอลที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่และสลับซับซ้อน มีสมบัติเป็นกรดอ่อนและมีรสฝาด เป็นสารที่แยกให้บริสุทธิ์ได้ยากเพราะไม่ตกผลึก พบได้ทั้งในรูปอิสระและรูปไกลโคไซด์ คุณสมบัติและชนิดของแทนนินขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น Proanthocyanidins ดังภาพที่ 2-7



Proanthocyanidins

ภาพที่ 2-7 ตัวอย่างของสารกลุ่มแทนนิน

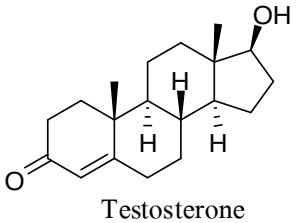
2.3.7. เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) หรือ เทอร์พีน (Terpenes) ประกอบด้วยหน่วยเล็กที่สุดเรียกว่า Isoprene unit ซึ่งเป็น Branch chain ของคาร์บอน 5 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น Sesquiterpenes พบในฮอร์โมนของแมลง Diterpenes พบในสัตว์ทะเลจำพวกฟองน้ำ Triterpenoids มักพบในพืชในรูปของ Cardiac glycosides, Saponin และ Phytosterol ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น สามารถต้านไวรัสได้ ตัวอย่างเช่น Andrographolide ที่พบในต้นฟ้าทะลายโจร ดังภาพที่ 2-8



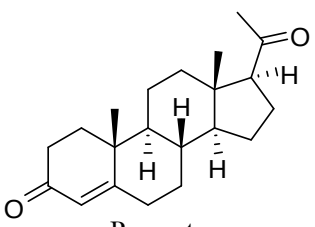
Andrographolide

ภาพที่ 2-8 ตัวอย่างของสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์

2.3.8 สเตียรอยด์ (Steroids) เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารในกลุ่ม Tetracyclic triterpenes คือมีวงแหวนเชื่อมต่อกันที่เป็นโครงสร้างหลัก 4 วง โดยมีวงแหวนหกเหลี่ยม 3 วง และวงแหวนห้าเหลี่ยมอีก 1 วง โครงสร้างพื้นฐานเป็น Cyclopentano-perhydrophenanthrene nucleus เป็นสารที่มีความสำคัญเนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ ยารักษาโรคหัวใจ (Cardiac glycosides) ยาขับปัสสาวะ ยาคุมกำเนิดหลายชนิด และเป็นฮอร์โมนเพศ ตัวอย่างเช่น Testosterone และ Progesterone ดังภาพที่ 2-9



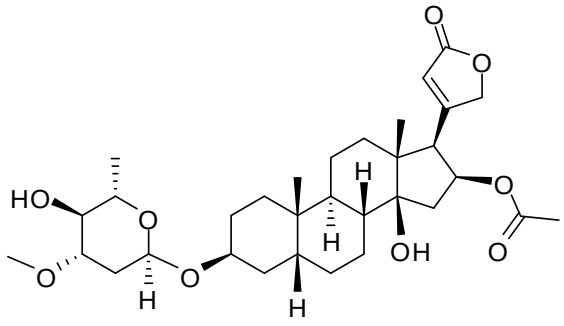
Testosterone



Progesterone

ภาพที่ 2-9 ตัวอย่างของสารกลุ่มสเตียรอยด์

2.3.9. คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ใช้รักษาโรคหัวใจวาย (Congestive heart failure) ผลในการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของ Aglycone และชนิด (และจำนวน) ของน้ำตาล ซึ่งน้ำตาลจะช่วยให้ไกลโคไซด์ละลายได้ดีขึ้น เป็นผลให้การดูดซึมและการกระจายตัวของสารในร่างกายเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้การออกฤทธิ์ของสารดียิ่งขึ้น มีการนำมาใช้ในการรักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติ ตัวอย่างเช่น Oleandrin ดังภาพที่ 2-10



Oleandrin

ภาพที่ 2-10 ตัวอย่างของสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

2.4 อนุมูลอิสระ (Free radical) (นวลศรี รักอริยธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข, 2546)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว 1 หรือมากกว่า เนื่องจากการสูญเสียอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว หรือมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวเพิ่มขึ้น อาจเป็นประจุลบ ประจุบวก หรือเป็นกลางก็ได้ ปกติโมเลกุลจะสมดุลเมื่ออิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ แต่มีบางครั้งที่โมเลกุลบางชนิดสูญเสียอิเล็กตรอนไปหนึ่ง ทำให้อิเล็กตรอนขาดคู่ จึงไปดึงเอาอิเล็กตรอนจากอะตอมหรือโมเลกุลอื่นมาเข้าคู่เพื่อทำให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นเสถียรมากขึ้น ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นขาดอิเล็กตรอน จึงกลายเป็นอนุมูลอิสระขึ้นมาแล้วไปดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นที่อยู่ใกล้ชิดกัน ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระมีอายุสั้นมากประมาณ 10^{-3} หรือ 10^{-10} วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและไม่เฉพาะเจาะจง ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นได้กับทุกโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ ไขมัน และโปรตีน ความเสียหายจะเกิดขึ้นกับโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบย่อยของเซลล์ เมื่อเกิดขึ้นจะทำให้เซลล์เสียหายและสูญเสียหน้าที่ไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงเคมีหรือเชิงกายภาพของเซลล์ และในที่สุดจะเกิดเป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมสภาพของร่างกาย (Degenerative disease) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น ซุปเปอร์

ออกไซด์ (Superoxide anion radical, O_2•), ไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, OH•), เปอร์ออกซิล (Peroxyl radical, ROO•), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2), โอโซน(Ozone, O_3) เป็นต้น อนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. อนุมูลอิสระที่เกิดภายในร่างกายของเราเอง เป็นผลจากการที่ภายในร่างกายของเรามี กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) เกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของเซลล์ในร่างกาย ที่ต้องดำเนินการตามปกติ ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คืออนุมูลอิสระ สารตัวนี้สามารถรวมตัวกับไขมัน LDL (Low Density Lipoproteins) ได้ดี และยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์มีผลต่อการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย (เจนจิรา จิรัม และประสงค์ สีหานาม, 2554) เช่น เอนไซม์ลิพอกซีจีเนส (Lipoxygenase) ทำหน้าที่เร่งการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated acid) ซึ่งโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กรดไขมันเกิดเป็น Hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไปได้

2. อนุมูลอิสระที่มาจากนอกร่างกาย ซึ่งเกิดได้หลายปัจจัย คือ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสียรถยนต์ เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่น จากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง กลับมาใช้อีก หรือเกิดจากการปิ้ง ย่าง จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (Doxorubicin) เพนนิซิลามิน (Penicillamine) พาราเซตามอล (Paracetamol) เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว (Atherosclerosis) เกิดการกลาย (Mutation) ของเซลล์ทำให้เกิดมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์หรือโรคความจำเสื่อม ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อรุนแรงขึ้น โรคไขข้ออักเสบและความเสื่อมของร่างกาย เป็นต้น จากที่กล่าวมาจะเห็นว่า อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง และในสภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายได้รับมลภาวะแวดล้อม ภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องมีระบบป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายได้ สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องตนเอง เรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) (อนันต์ สกุลกิม, 2551)

2.4.1 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระคือสารที่ช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ หรือเกิดการเปลี่ยนเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็ง สารอาหาร เช่น เบต้าแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี สังกะสี และเซเลเนี่ยม เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบกันมานานแล้วว่าสามารถช่วยลดความเป็นพิษของสาร พิษที่ร่างกายได้รับจากสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวและช่วยลดการทำลายเซลล์โดยอนุมูลอิสระ จึงช่วยชะลอ ความทรุดโทรมของร่างกายและป้องกันการเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic substance) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol), Alkyl gallate, BHA, BHT, TBHQ และสารอื่น ๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

2. Oxygen scavenger สารกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี, Ascorbyl erythorbic acid (Isoascorbic acid) และ Sodium erythorbate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

3. Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ Dilauryl thiopropionate และ Thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ Lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

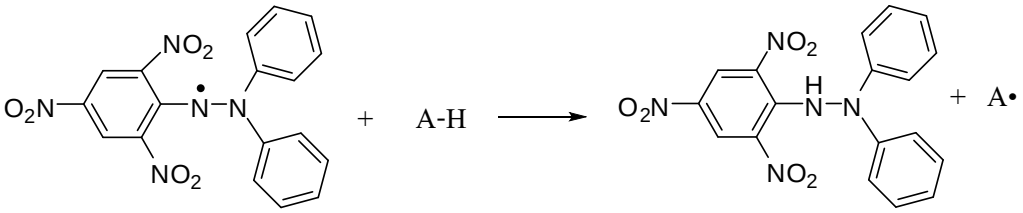
4. Enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งเป็น Primary antioxidant enzyme และ Ancillary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

5. Chelating agent หรือ Sequestrant สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2544)

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระมีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งมีหนึ่งวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ วิธี DPPH free radical scavenging assay โดยใช้ 1,1-diphenyl-2-picryhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นได้ โดยสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในระยะเวลาที่กำหนด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าความสามารถในการดูดกลืนแสงลดลง บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (กัลยาณี วัฒเนธีรางกูร, 2551) ดังภาพที่ 2-11

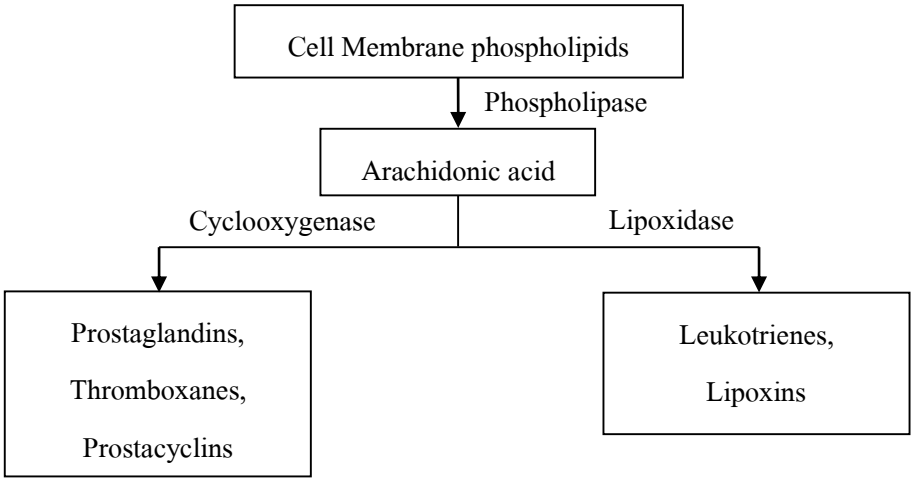


DPPH• (สีม่วง) สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH:H (สีเหลือง)

ภาพที่ 2-11 ปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH

2.5 เอนไซม์ลิพอกซิเดส (Lipoxidase)

เอนไซม์ลิพอกซิเดสเป็นอีกชื่อหนึ่งของเอนไซม์ลิพอกซิจีเนส (Lipoxygenase) มีพบทั่วไปในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะถั่วเหลือง นอกจากจะพบเอนไซม์ลิพอกซิเดสในพืชแล้วยังพบในสัตว์ แต่มีความจำเพาะเจาะจงต่างกันกับลิพอกซิเดสในพืช เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อสัตว์ ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบทั้งโดยตรงและโดยอ้อม คือ เกิดการย่อยสลายกรดไขมันที่จำเป็น เช่น กรดลิโนเลอิก กรดลิโนเลนิก และกรดอะราชิโดนิก รวมถึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) นอกจากนี้เอนไซม์ลิพอกซิเดสยังเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory) โดยเป็นเอนไซม์ที่ผลิตสารที่ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบต่าง ๆ (Pro-inflammatory eicosanoids) จากกรดไขมัน (Fatty acid) (ไพรัช ประสงค์จีน, 2527) โดยเอนไซม์ลิพอกซิเดสจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมันทำให้เกิดสารในกลุ่ม Ecosanoids เช่น Leukotrienes และ Lipoxins ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ มีกระบวนการผลิตสารที่ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบ ดังภาพที่ 2-12



ภาพที่ 2-12 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารที่ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบ

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 การศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากแคนา

Phomkaivon and Areekul (2009) รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น วิธี 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity วิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) จากสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล ของพืชป่าที่กินได้ของไทยทั้งหมด 20 ชนิด พบว่าสารสกัดจากดอกแคนา (*Dolichandrone. serrulata*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP เมื่อเทียบกับพืชชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากพืชชนิดต่าง ๆ

สารสกัดหยาบเอทานอล จากพืชชนิดต่าง ๆ	วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		
	DPPH (mgGAE/g)[a]	TEAC (mMTE/g)[b]	FRAP (mgAscAE/g)[c]
Dolichandrone serrulata (แคนา)	15.46 ± 1.32	0.65 ± 0.01	12.51 ± 0.66
Embelia ribes Burm f.	0.35 ± 0.01	27.77 ± 1.13	60.75 ± 0.16
Momordica charantia L.	0.58 ± 0.02	2.42 ± 0.03	3.38 ± 0.08
Micromelum minutum Wight & Arn	1.20 ± 0.02	13.40 ± 0.08	24.07 ± 0.25
Melicope pteleifolia	5.67 ± 0.07	0.69 ± 0.01	6.38 ± 0.14
Schima wallichii (DC.) Korth	0.08 ± 0.00	69.03 ± 2.93	213.40 ± 17.90
Tiliacora triandra (Colebr.) Diels	6.86 ± 0.13	0.67 ± 0.01	5.15 ± 0.09
Vaccinium sprengelii (G.Don) Sleum.	0.53 ± 0.01	56.06 ± 0.13	63.67 ± 0.27

[a]: mgGAE/g คือ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม

[b]: mMTE/g คือ มิลลิโมลาร์สมมูลของโทรลอกซ์ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม

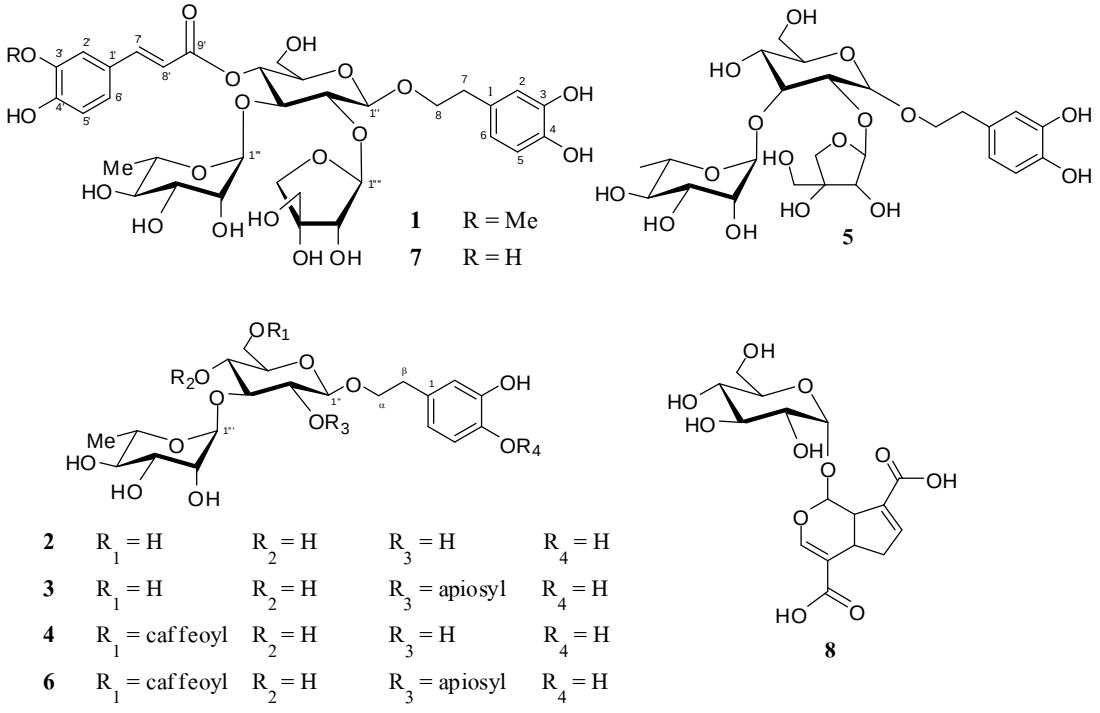
[c]: mgAscAE/g คือ มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารกัดแห้ง 1 กรัม

Daduang, J., Vichitphan, Daduang, S., Hongsprabhas and Boonsiri (2011) รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลของผักท้องถิ่น 30 ชนิด พบว่าดอกแคนา (*Dolichandrone serrulata*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 12.98 ± 0.02 mgGAE/g และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 0.30 ± 0.01 mMTEAC/g และวิธี FRAP เท่ากับ 86.02 ± 0.09 μmolFe(II)/g

Thummajitasakul et al. (2014) รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบชั้นน้ำและชั้นเอทานอลจากพืชพื้นบ้านของไทย 8 ชนิด พบว่าใบแคนามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อเทียบกับพืชชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ส่วนสกัดชั้นเอทานอลของใบแคนามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *B. subtilis, B. cereus, S. aureus* และ *S. epidermis*

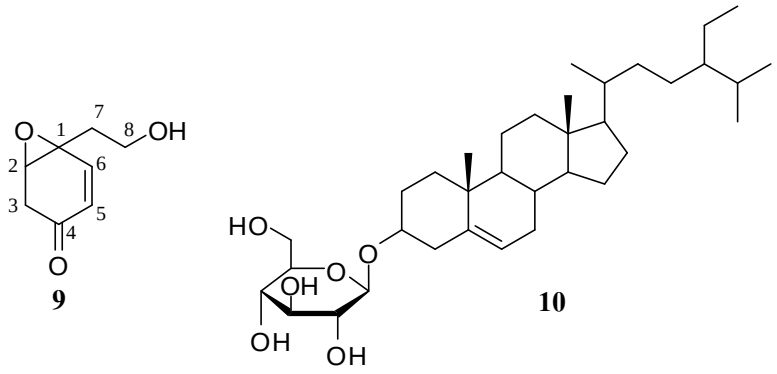
2.6.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแคนา

Sinaphet, Noiarsa, Rujirawat, Otsaku and Kanchanapoom (2006) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของกิ่งแคนา (*Dolichandrone serrulata*) พบ Phenolic triglycoside ชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ Dolichandroside (**1**) นอกจากนี้ยังพบสารที่เคยมีรายงานไว้แล้วอีก 7 ชนิด คือ Decaffeoyl-verbascoside (**2**), Verbascoside (**3**), Isoverbascoside (**4**), Markhamioside A (**5**), Luteoside B (**6**), 2′′-*O*-apiosylverbascoside (**7**) และ Ixoside (**8**) โครงสร้างของสารทั้งหมดที่แยกได้ถูกยืนยันด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังภาพที่ 2-13



ภาพที่ 2-13 โครงสร้างของสาร Phenolic triglycoside ที่แยกได้จากกิ่งแคนา

Pancharoen and Klomkaew (2010) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตพบ Cyclohexylethanoid ชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ (**9**) และยังพบสเตียรอยด์ไกลโคไซด์ที่มีรายงานไว้แล้วคือ Sitosterol-3-*O*-*β*-D-glucoside (**10**) นอกจากนี้ยังนำสาร Cyclohexylethanoid ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Ethyl phenylpropiolate (EPP)-induce ear edema in rats พบว่า Cyclohexylethanoid มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Phenylbutazone ดังตารางที่ 2-2



9 **10**

ภาพที่ 2-14 โครงสร้างของ Cyclohexylethanoid และ Sitosterol-3-*O*-*β*-D-glucoside

ตารางที่ 2-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของ Cyclohexylethanoid (**9**) ด้วยวิธี ethyl phenylpropiolate (EPP)-induce ear edema in rats

Group	Dose mg/ear	Time after topical application of EPP			
		15 min		30 min	
		ED (μm)	ED (%)	ED (μm)	ED (%)
Control acetone	-	80 ± 29.4	-	205 ± 9.6	-
Phenylbutazone	1	15 ± 5.0	81.3	65 ± 15.0**	65.9
9	1	25 ± 5.0	62.5	120*	41.5

Values are expressed as mean ± S.E.M. (N=4). Statistically significant from control group: *P<0.05, **P<0.001

ตารางที่ 2-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของ Cyclohexylethanoid (**9**) ด้วยวิธี ethyl phenylpropiolate (EPP)-induce ear edema in rats (ต่อ)

Group	Dose mg/ear	Time after topical application of EPP			
		1h		2h	
		ED (μm)	ED (%)	ED (μm)	ED (%)
Control acetone	-	285 ± 9.6	-	225 ± 9.6	-
Phenylbutazone	1	135 ± 20.7*	52.6	135 ± 20.6*	47.1
9	1	165 ± 5.0**	42.1	135 ± 5.0**	47.1

Values are expressed as mean ± S.E.M. (N=4). Statistically significant from control group: *P<0.05, **P<0.001

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) บริษัท Buchi รุ่น R-3
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler รุ่น AE200
3. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer บริษัท Thermo Scientific รุ่น Genesys 20
4. เครื่องอังน้ำ (Water bath) บริษัท Heto DT Hetrotherm
5. เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Wisemix รุ่น VM-10
6. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette) บริษัท Eppendorf
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate Reader) บริษัท Biotek รุ่น EPOCH-2
8. เครื่องเขย่า บริษัท Oragon Lab รุ่น MX-M
9. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) บริษัท Mettler toledo
10. จานหลุม (96-well plate)
11. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
12. บีกเกอร์ (Beaker)
13. กระบอกตวง (Graduated cylinder)
14. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
15. กรวยแก้ว (Glass funnel)
16. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
17. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
18. ขวดบรรจุสาร (Vial)
19. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
20. หลอดทดลอง (Test tube)
21. หม้อสแตนเลส

3.1.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น (Distilled water)
2. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH)

3. เมทานอล (Methanol, CH_3OH)

4. คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$)

5. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4)

6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)

7. กรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH)

8. แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3)

9. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) No.A463-500 G, Univar

10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) No.480507, Carlo erba

11. โซเดียมฟอสเฟต (Sodium phosphate tribasic dodecahydrate, $Na_3PO_4.12H_2O$) No. 10101-89-0, Sigma-Aldrich

12. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมอโนไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate monohydrate, $NaH_2PO_4.H_2O$) No.10049-21-5, Merck

13. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4) No. 7558-79-4, Merck

14. เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$) No.803945, Merck-Schuchardt

15. อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (Aluminium trichloride, $AlCl_3$) No.801081, Merck-Schuchardt

16. แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) No.0716-01, Baker Analyzed

17. ลวดแมกนีเซียม (Mg ribbon)

18. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) No.43180, Fluka

19. กรดแกลลิก (Gallic acid) No.48630, Fluka

20. วิตามินซี (Ascorbic acid) No.1.00127.0100, Merck

21. เคอร์ซิติน (Quercetin) No.33795-1, Aldrich

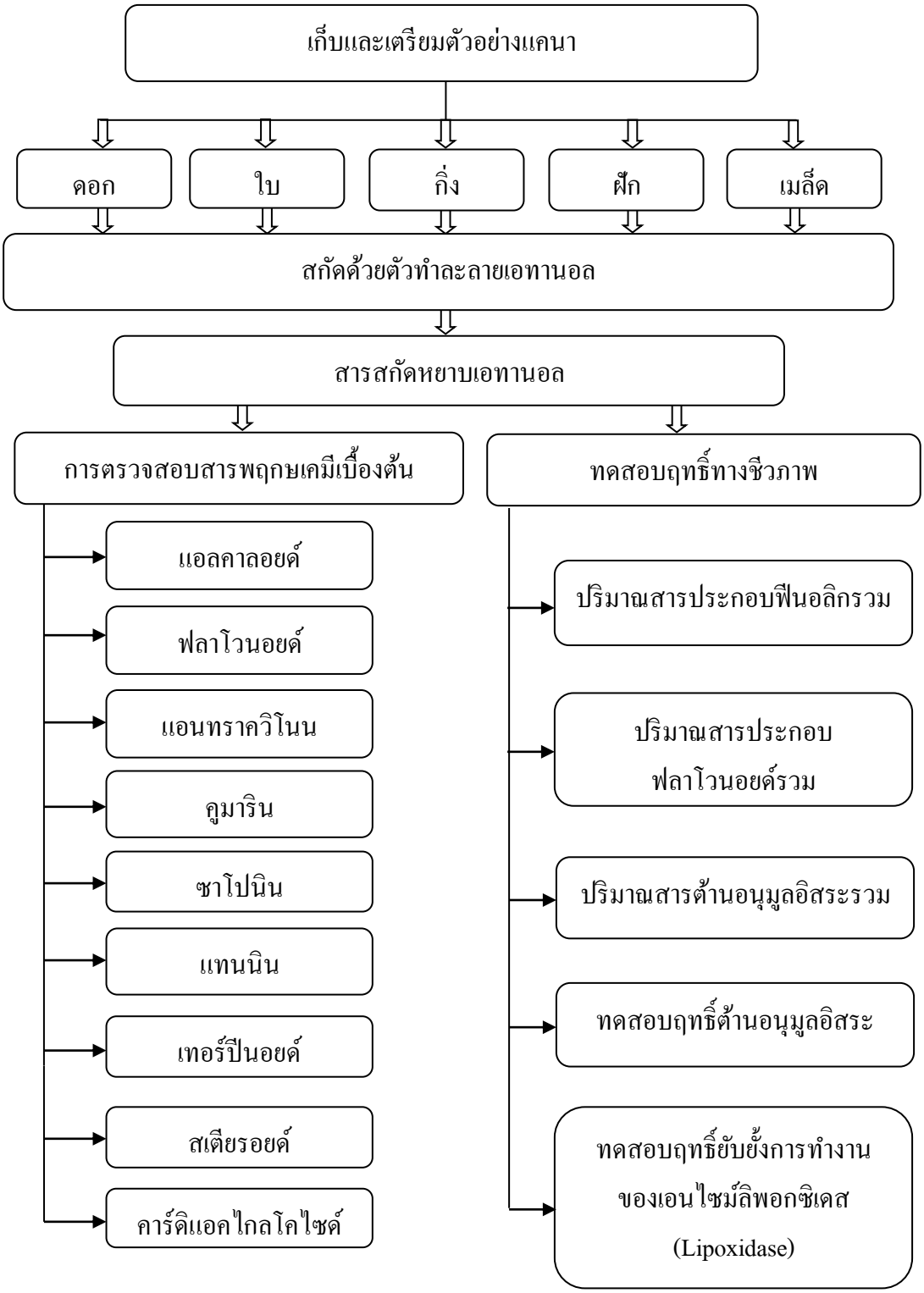
23. น้ำยาทดสอบดราเจนดอร์ฟ (Dragendroff's reagent)

24. น้ำยาทดสอบ ฟอลิน ซิโอแคลตู (Folin-Ciocalteu reagent) No.463562, Carlo erba

25. เอนไซม์ลิพอกซิเดส (Lipoxidase from glycine max, soybean) No.L7395-15MU, Sigma-Aldrich

26. Linoleic acid No.W338001-25G, Sigma-Aldrich

3.2 แผนการดำเนินการวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างแคนา

พืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ แคนา (*Dolichandrone serrulata*) ประกอบด้วย 5 ส่วน ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด โดยส่วนดอก ใบ และกิ่ง เก็บจากมหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2557 ในส่วนของฝัก และเมล็ด เก็บจากตำบลเหล่าหลวง อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557

3.3.2 วิธีการสกัดสารจากแคนา

นำตัวอย่างแคนา ทั้ง 5 ส่วน คือ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด ซึ่งดอก ใบ และกิ่ง เป็นตัวอย่างสด ส่วนฝัก และเมล็ด เป็นตัวอย่างแห้ง มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยทำการแยกบดแต่ละส่วนของแคนา และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างทั้ง 5 ส่วนของแคนามาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่างโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ได้สารสกัดหยาบเอทานอล (Ethanol extract) แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างที่ได้ และเก็บตัวอย่างไว้ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.3 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา (*Dolichandrone serrulata*) โดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนดังนี้ (Ayoola et al., 2008)

1. การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

2. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3. การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

4. การตรวจสอบคูมาริน (Coumarins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบคูมาริน

5. การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

6. การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

7. การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

8. การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียรอยด์

9. การตรวจสอบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด

เขย่า เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

3.3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic, Skerget, and Knez (2007) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารประกอบฟีนอลิกรวมจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวม เกิดเป็น Tungsten และ Molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, $mgGAE.g^{-1}$ dried extract)

3.3.5 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat, and Legret (1994) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะใช้ Phenolic hydroxyl groups ทำปฏิกิริยากับ $AlCl_3$ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น415 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

เคอร์ซิติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE.g^{-1} dried extract)

3.3.6 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant capacity)

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Prieto, Pineda, and Aguilar (1999) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับ Phosphomolybdate reagent สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารต้านอนุมูลอิสระรวมเกิดเป็น Molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (ความเข้มข้น 0.5-0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Phosphomolybdate reagent ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มบนเครื่องอังน้ำ ที่อุณหภูมิ 78 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานวิตามินซี ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Ascorbic acid equivalents, mgAE.g^{-1} dried extract)

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, and Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) จะเป็นสารละลายสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) จากสูตร % DPPH free radical inhibition = $[(A-B)/A] \times 100$ เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (Anti-lipoxidase assay)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสด้วยวิธี Colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Tappel (1962) และ Bazylko et al. (2013) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือเอนไซม์ลิพอกซิเดส เป็นอีกชื่อหนึ่งของเอนไซม์ลิพอกซิจีเนส (Lipoxygenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory) โดยเอนไซม์ลิพอกซิเดสจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมัน (Fatty acid) ทำให้เกิดสารในกลุ่ม Ecosanoids ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบ โดยสารในกลุ่มนี้ไม่มีสีสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร

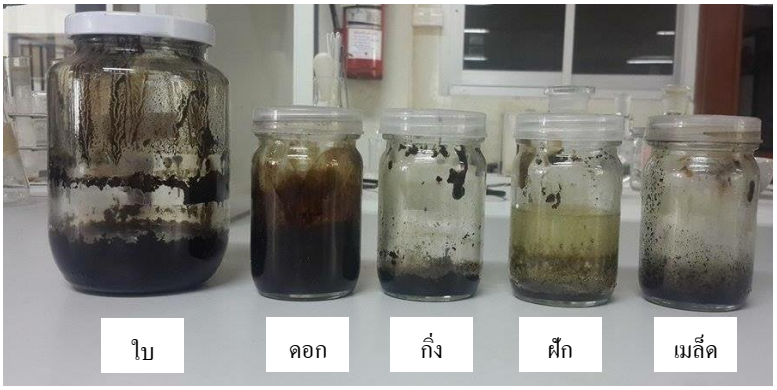
โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ลิพอกซิเดสความเข้มข้น 1000 U/mL ใน Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) ความเข้มข้น 0.08 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 50 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส (% Lipoxidase inhibition) จากสูตร % Lipoxidase inhibition = $[(A-B)/A] \times 100$ เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

การศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา (*Dolichandrone serrulata*) ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ ได้แบ่งการทดลองออกเป็น การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content) การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant capacity) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (Anti-lipoxidase assay) ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ซึ่งมีผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 การสกัดสารจากแคนา

ตัวอย่างแคนาทั้ง 5 ส่วน ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด ซึ่งดอก ใบ และกิ่ง เป็นตัวอย่างสด ส่วนฝัก และเมล็ด เป็นตัวอย่างแห้ง นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยทำการแยกบดแต่ละส่วนของแคนา และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างทั้ง 5 ส่วนของแคนามาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่าง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้เป็นสารสกัดหยาบเอทานอล (Ethanol extract) ที่มีน้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต (Percentage yield) และลักษณะต่าง ๆ ทางกายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักตัวอย่างพืช น้ำหนักสารสกัด ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลของแคนา

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)		ร้อยละผลผลิต	ลักษณะของสารที่สกัดได้
	ตัวอย่างพืช	สารสกัด		
ดอก	1,680.18	48.71	2.90	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ใบ	1,197.07	80.92	6.76	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม
กิ่ง	382.23	6.41	1.68	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ฝัก	152.58	2.06	1.35	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาล
เมล็ด	98.61	1.93	1.96	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม

จากการสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนาให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 6.76% รองลงมาคือ ดอก (2.90%) เมล็ด (1.96%) กิ่ง (1.68%) และฝัก (1.35%) ตามลำดับ

4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา (*Dolichandrone serrulata*) โดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ตรวจพบสารพฤกษเคมีจากส่วนสกัดหยาบเอทานอลของส่วนต่าง ๆ ของแคนา คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ดังแสดงในตารางที่ 4-2

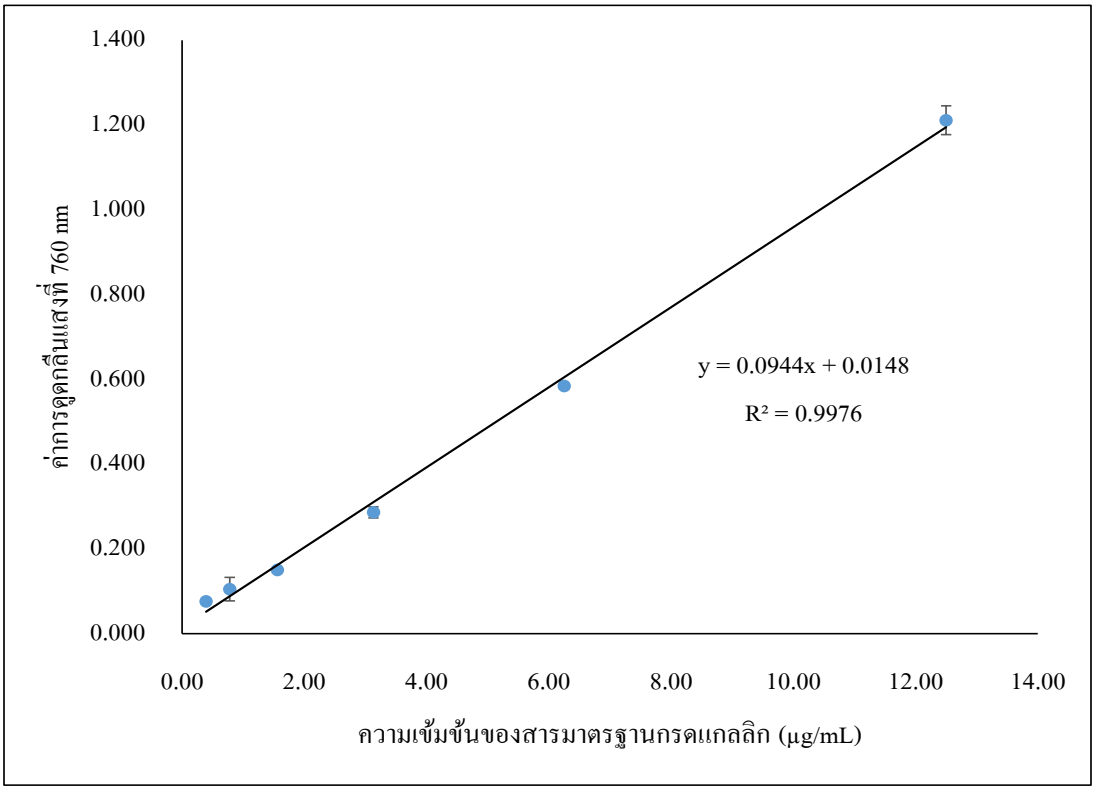
ตารางที่ 4-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

สารพฤกษเคมี	สารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา				
	ดอก	ใบ	กิ่ง	ฝัก	เมล็ด
แอลคาลอยด์	-	-	-	-	-
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+
แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-
คูมาริน	+++	+	++	+	+
ซาโปนิน	+	++	+	-	+
แทนนิน	-	+++	+++	-	+
เทอร์ปีนอยด์	++	++	+++	+++	++
สเตียรอยด์	-	+++	++	+	-
คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	+++	+++	+++	+	+

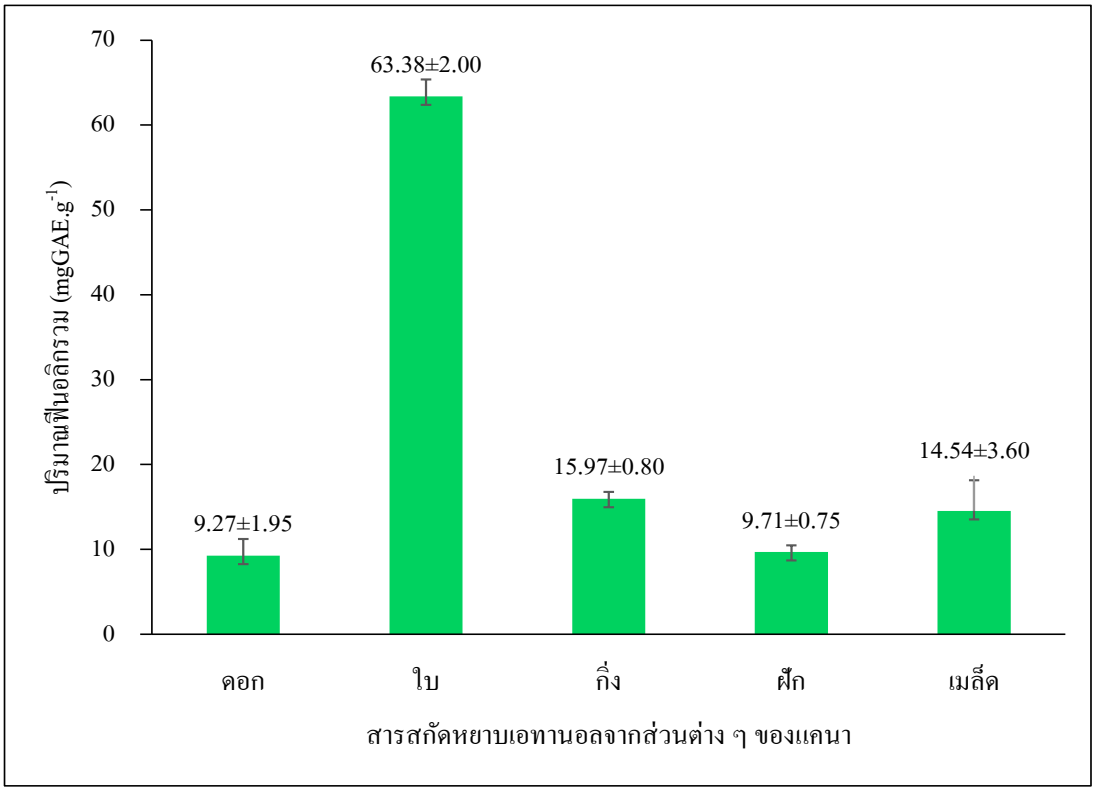
หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ
+ หมายถึง ตรวจสอบพบน้อย
++ หมายถึง ตรวจสอบพบปานกลาง
+++ หมายถึง ตรวจสอบพบมาก

4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ซึ่งใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก คือ $y = 0.0944x + 0.0148$ ($R^2 = 0.9976$) และทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนาด้วยวิธีเดียวกับสารมาตรฐาน และใช้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกข้างต้นในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mgGAE.g^{-1} dried extract) พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดเท่ากับ 63.38 ± 2.00 mgGAE.g^{-1} รองลงมา คือ กิ่ง (15.97 ± 0.80 mgGAE.g^{-1}) เมล็ด (14.54 ± 3.60 mgGAE.g^{-1}) ฝัก (9.71 ± 0.75 mgGAE.g^{-1}) และดอก (9.27 ± 1.95 mgGAE.g^{-1}) ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-2 และ 4-3



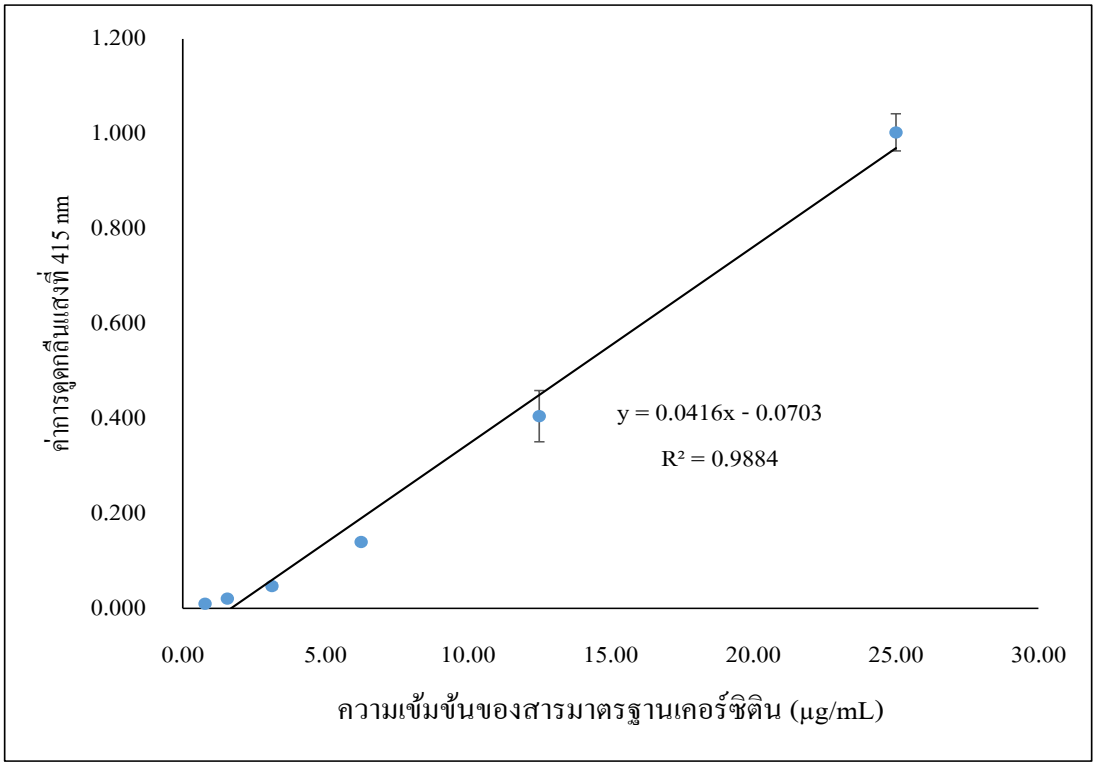
ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก



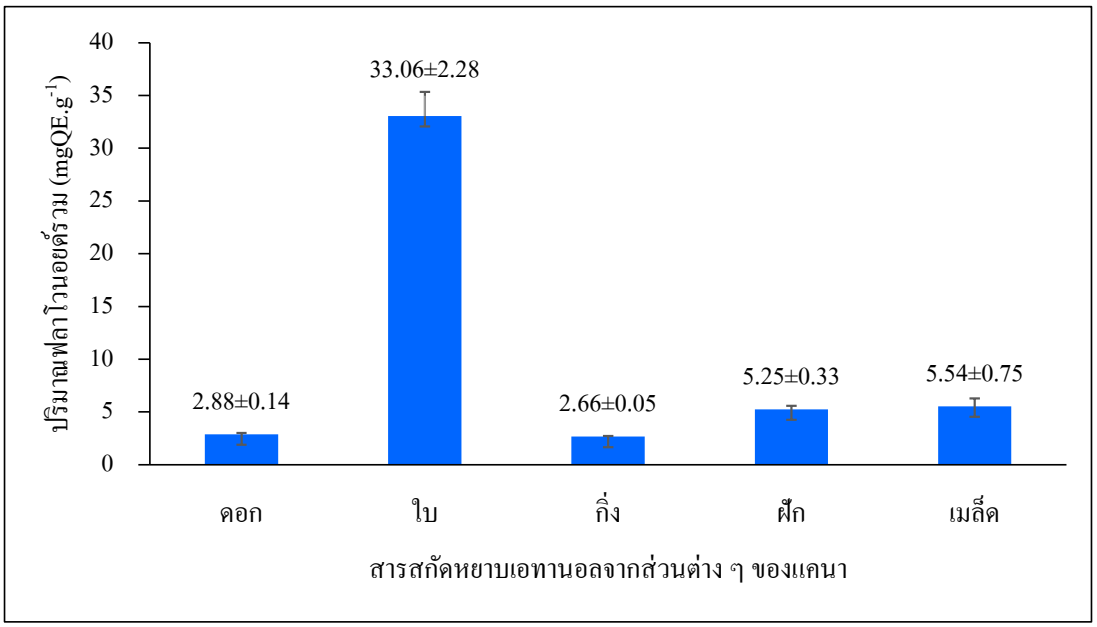
ภาพที่ 4-3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน คือ $y = 0.0416x - 0.0703$ ($R^2 = 0.9884$) และทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนาด้วยวิธีเดียวกับสารมาตรฐาน และใช้กราฟมาตรฐานเคอร์ซิตินข้างต้นในการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, $mgQE.g^{-1}$ dried extract) พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 33.06 ± 2.28 $mgQE.g^{-1}$ รองลงมา คือ เมล็ด (5.54 ± 0.75 $mgQE.g^{-1}$) ฝัก (5.25 ± 0.33 $mgQE.g^{-1}$) ดอก (2.28 ± 0.14 $mgQE.g^{-1}$) และกิ่ง (2.66 ± 0.05 $mgQE.g^{-1}$) ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-4 และ 4-5



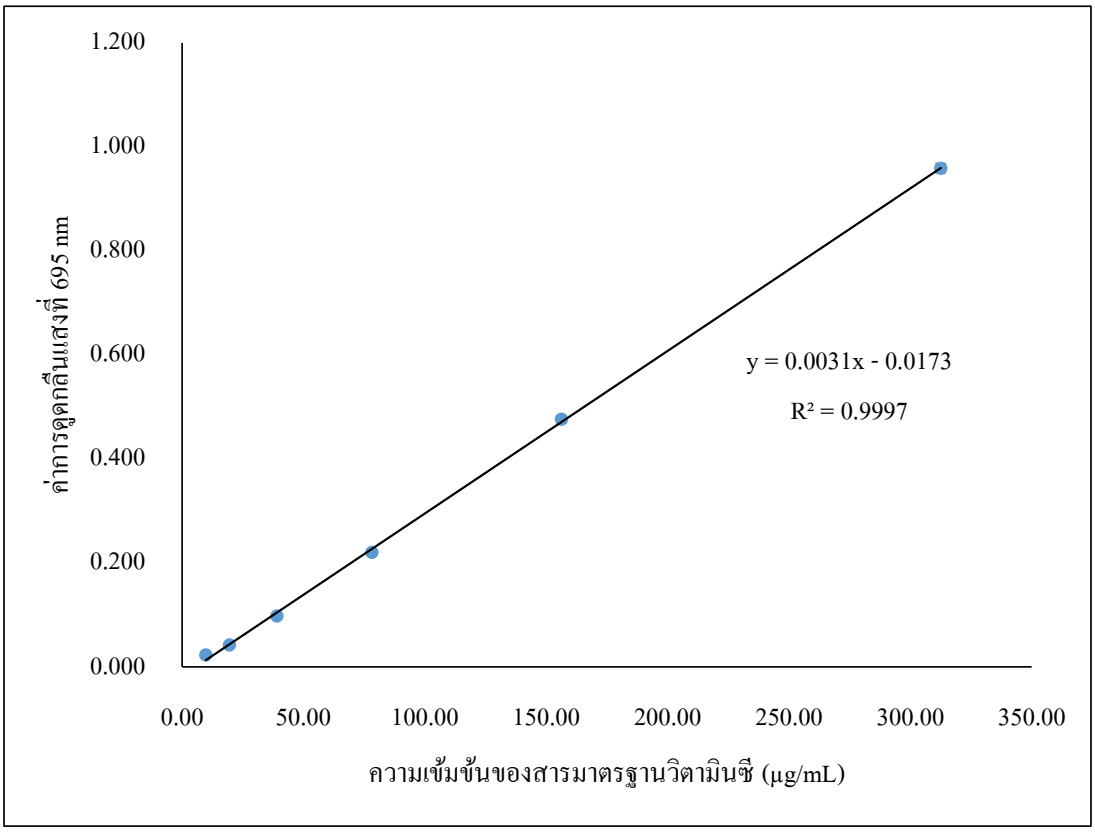
ภาพที่ 4-4 กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน



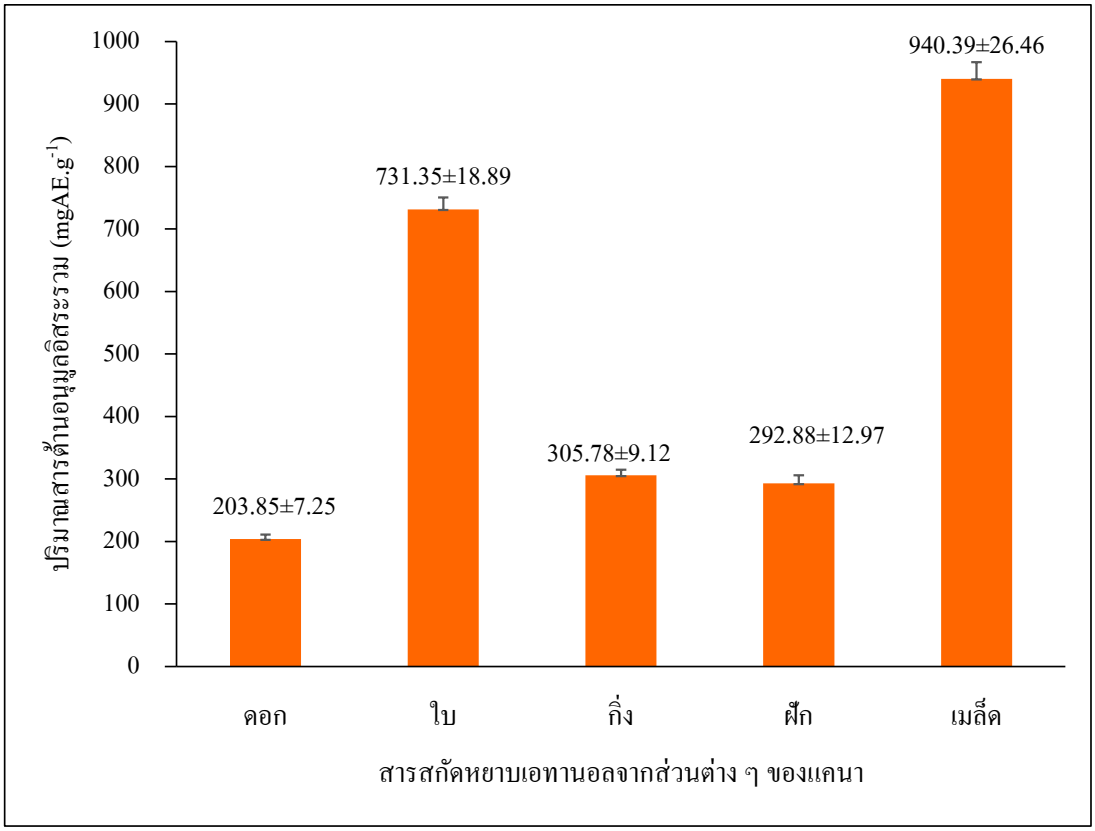
ภาพที่ 4-5 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

4.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity)

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric ซึ่งใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี $y = 0.0031x - 0.0173$ ($R^2 = 0.9997$) และทำการทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนาด้วยวิธีเดียวกับสารมาตรฐาน และใช้กราฟมาตรฐานวิตามินซีในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารตัวอย่างรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Ascorbic acid equivalents, $mgAE.g^{-1}$ dried extract) พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดแคนามีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมมากที่สุดเท่ากับ 940.39 ± 26.46 $mgAE.g^{-1}$ รองลงมา คือ ใบ (731.35 ± 18.89 $mgAE.g^{-1}$) กิ่ง (305.78 ± 9.12 $mgAE.g^{-1}$) ฝัก (292.88 ± 12.97 $mgAE.g^{-1}$) และดอก (203.85 ± 7.25 $mgAE.g^{-1}$) ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-6 และ 4-7



ภาพที่ 4-6 กราฟมาตรฐานวิตามินซี



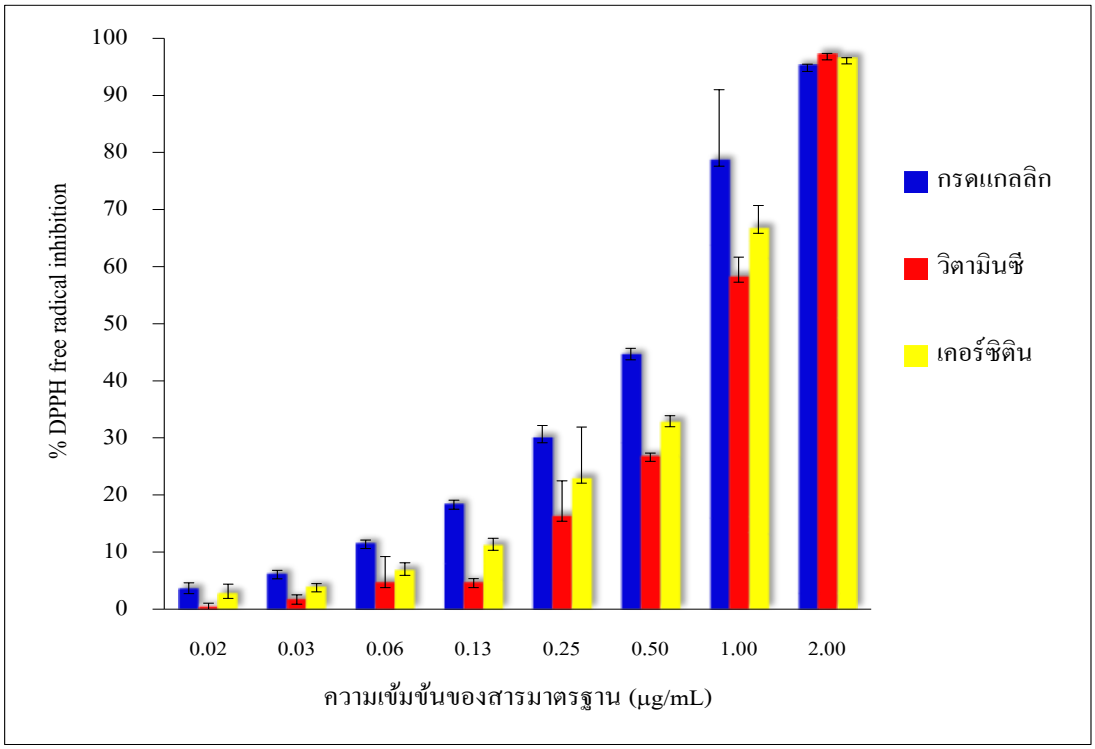
ภาพที่ 4-7 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ซึ่งใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ได้ผลการทดลองแสดงเป็นร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 µg/mL กรดแกลลิกมีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 78.59 ± 12.39 รองลงมา คือ เคอร์ซิติน (66.82 ± 3.88%) และวิตามินซี (58.28 ± 3.37%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-8

ตารางที่ 4-3 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)		
(µg/mL)	กรดแกลลิก	วิตามินซี	เคอร์ซิติน
0.02	3.70 ± 0.90	0.52 ± 0.52	2.90 ± 1.46
0.03	6.30 ± 0.51	1.87 ± 0.65	4.02 ± 0.45
0.06	11.63 ± 0.46	4.79 ± 4.42	6.92 ± 1.18
0.13	18.52 ± 0.56	4.79 ± 0.57	11.31 ± 1.12
0.25	30.15 ± 2.00	16.40 ± 6.08	23.07 ± 8.82
0.50	44.67 ± 1.02	26.89 ± 0.47	32.96 ± 0.90
1.00	78.59 ± 12.39	58.28 ± 3.37	66.82 ± 3.88
2.00	95.19 ± 0.26	97.23 ± 0.13	96.50 ± 0.13

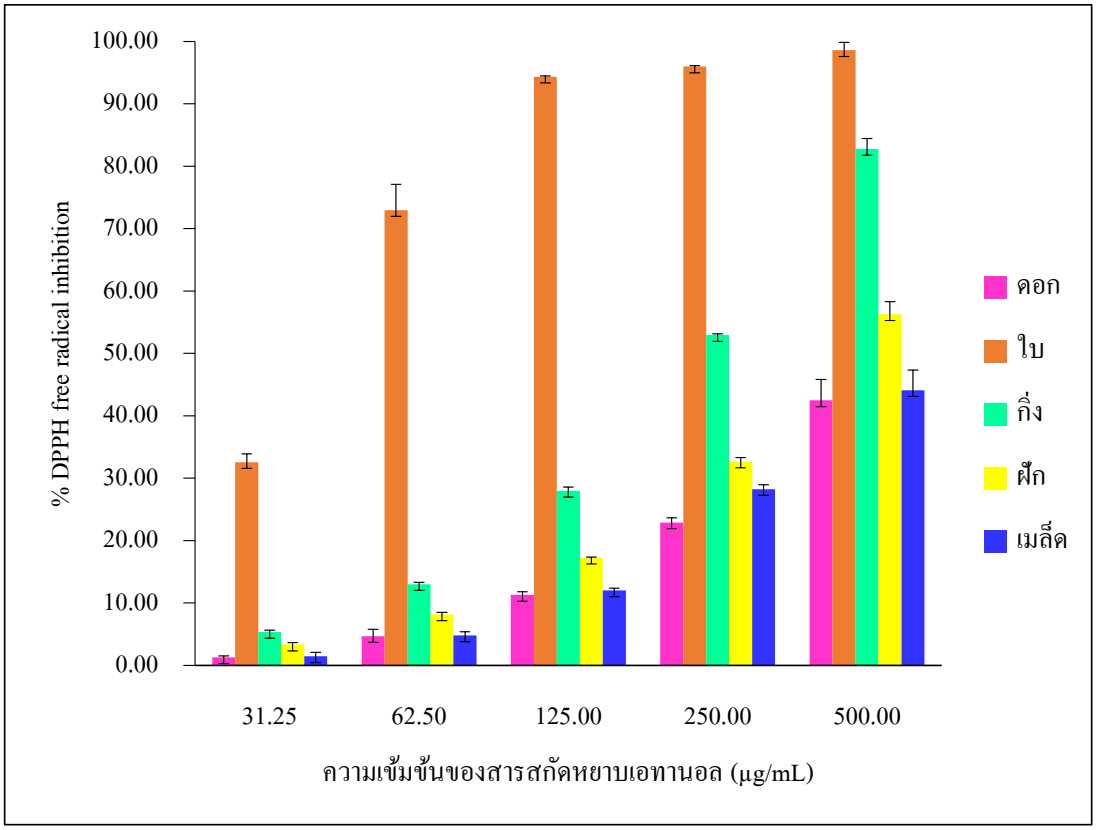


ภาพที่ 4-8 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา ด้วยวิธีเดียวกับสารมาตรฐานข้างต้น แสดงผลการทดลองเป็นร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) พบว่าที่ความเข้มข้น 500.00 µg/mL สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนา มีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 98.60 ± 1.23 รองลงมา คือ กิ่ง (82.75 ± 1.71%) ฝัก (56.24 ± 2.04%) เมล็ด (44.10 ± 3.23%) และดอก (42.48 ± 3.35%) ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-9

ตารางที่ 4-4 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/mL)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)				
	ดอก	ใบ	กิ่ง	ฝัก	เมล็ด
31.25	1.30 ± 0.22	32.56 ± 1.33	5.36 ± 0.30	3.33 ± 0.31	1.46 ± 0.63
62.50	4.68 ± 1.09	72.96 ± 4.12	13.01 ± 0.30	8.15 ± 0.35	4.80 ± 0.58
125.00	11.30 ± 0.59	94.33 ± 0.13	27.97 ± 0.63	17.24 ± 0.12	12.01 ± 0.38
250.00	22.89 ± 0.75	95.96 ± 0.13	52.94 ± 0.20	32.65 ± 0.65	28.24 ± 0.70
500.00	42.48 ± 3.35	98.60 ± 1.23	82.75 ± 1.71	56.24 ± 2.04	44.10 ± 3.23



ภาพที่ 4-9 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

4.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (Anti-Lipoxidase Assay)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสด้วยวิธี Colorimetric ซึ่งใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือเอนไซม์ลิพอกซิเดส (Lipoxidase) เป็นอีกชื่อหนึ่งของเอนไซม์ลิพอกซิจีเนส (Lipoxygenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory) โดยเอนไซม์ลิพอกซิเดสจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมัน (Fatty acid) ทำให้เกิดสารในกลุ่ม Ecosanoids ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบ โดยสารในกลุ่มนี้ไม่มีสีสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ในการทดลองจะใช้กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) ทำหน้าที่เป็นซับสเตรทในปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ลิพอกซิเดสจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดลิโนเลอิก และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ซึ่งผลการทดสอบกับสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนามีร้อยละของการยับยั้งการทำงาน

ของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (% Lipoxidase inhibition) มากที่สุดเท่ากับ 97.19 ± 0.63 รองลงมา คือ กิ่ง (95.42 ± 0.43%) เมล็ด (85.34 ± 0.20%) ฝัก (82.17 ± 0.13%) และดอก (38.39 ± 0.26%) ตามลำดับ แสดงในตาราง 4-5, 4-6 และภาพที่ 4-10

ตารางที่ 4-5 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนดอก ใบ และกิ่งของแคนาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

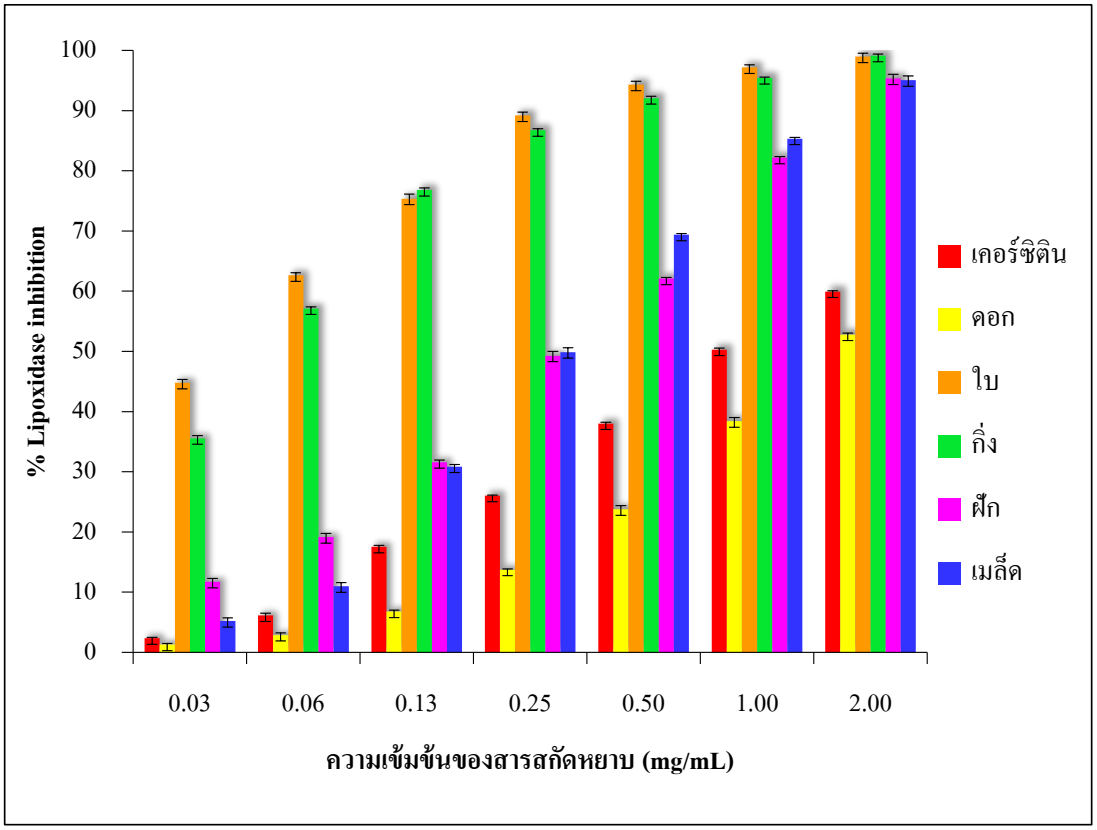
ความเข้มข้นของสาร (mg/mL)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (% Lipoxidase inhibition)			
	เคอร์ซิติน[a]	ดอก	ใบ	กิ่ง
0.03	2.34 ± 1.34	1.28 ± 0.13	44.76 ± 0.21	35.56 ± 0.57
0.06	6.14 ± 1.75	2.87 ± 0.35	62.63 ± 0.36	57.13 ± 0.43
0.13	17.54 ± 0.88	6.79 ± 0.23	75.36 ± 0.21	76.83 ± 0.77
0.25	26.02 ± 1.34	13.73 ± 0.13	89.19 ± 0.12	86.73 ± 0.57
0.50	38.01 ± 1.01	23.76 ± 0.23	94.32 ± 0.63	92.07 ± 0.57
1.00	50.29 ± 1.01	38.39 ± 0.26	97.19 ± 0.63	95.42 ± 0.43
2.00	59.94 ± 1.01	52.79 ± 0.13	98.99 ± 0.24	99.13 ± 0.57

[a]: สารมาตรฐาน

ตารางที่ 4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนฝัก และเมล็ดของแคนาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (mg/mL)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (% Lipoxidase inhibition)		
	เคอร์ซิติน[a]	ฝัก	เมล็ด
0.03	2.34 ± 1.34	11.72 ± 0.45	5.20 ± 0.54
0.06	6.14 ± 1.75	19.14 ± 0.25	10.99 ± 0.61
0.13	17.54 ± 0.88	31.59 ± 0.33	30.85 ± 0.35
0.25	26.02 ± 1.34	49.27 ± 0.25	49.88 ± 0.74
0.50	38.01 ± 1.01	62.08 ± 0.33	69.39 ± 0.20
1.00	50.29 ± 1.01	82.17 ± 0.13	85.34 ± 0.20
2.00	59.94 ± 1.01	95.34 ± 0.25	95.04 ± 0.71

[a]: สารมาตรฐาน



ภาพที่ 4-10 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม พร้อมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบของแคนามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดสมากที่สุด ซึ่งผลดังกล่าวน่าจะเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมที่ตรวจพบมากที่สุดในสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนา และนอกจากนี้ผลดังกล่าวยังยืนยันด้วยการตรวจทางพฤกษเคมี โดยสารที่พบส่วนใหญ่ในใบของแคนาเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น แทนนิน ซึ่งสารดังกล่าวสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2544)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา (*Dolichandrone serrulata*) ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝัก และเมล็ด พบสารพฤกษเคมี 7 ชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 63.38 ± 2.00 mgGAE.g^{-1} และ 33.11 ± 2.22 mgQE.g^{-1} ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดแคนามีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมมากที่สุดเท่ากับ 940.39 ± 26.46 mgAE.g^{-1}

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา พบว่า ที่ความเข้มข้น 500.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนามีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) มากที่สุดเท่ากับ 98.60 ± 1.23 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ คือ เอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนามีร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (% Lipoxidase inhibition) มากที่สุดเท่ากับ 97.19 ± 0.63 และนอกจากนี้พบว่าสารสกัดดังกล่าวข้างต้นมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสสูงกว่าสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (50.29 ± 1.01%) อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยต่อไปควรแยกองค์ประกอบเพื่อหาโครงสร้างทางเคมี และทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรมาใช้แทนยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรคต่อไป

บรรณานุกรม

กัลยาณี วัฒนธีรางกูร. (2551). *ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการเมล็ดสบู่ดำ (Jatropha curcas* Linn.*)*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีสำหรับครู, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2553). *ฐานข้อมูลสมุนไพร*. เข้าถึงได้จาก http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=28

เจนจิรา จิรัม และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*, *1*(1), 59-70.

นันทวัน บุญยะประภัศร. (2544). การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร. ใน นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ (บรรณาธิการ), *เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่มที่ 1* (หน้า 129-164). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข. (2546). *แอนติออกซิเดนท์ สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 2). เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). *เอนไซม์ทางอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 3).กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผกากรอง ทองดียิ่ง, ศุณิตา มากชูชิต, สุมาลี ปานทอง, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อิฐรัตน์. (2555). การยังยั้งการสร้าง PGE2 จากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ของสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้ (Dioscorea membranacea). ใน *การประชุมเครือข่ายวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 1*.

ไพรัช ประสงค์จีน (2527). Non-steroidal anti inflammatory drugs. *ขอนแก่นเวชสาร*, *8*, 30-49.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันดี กฤษณพันธ์. (2544). พฤกษเคมีเบื้องต้น. ใน นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ (บรรณาธิการ), *เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่มที่ 1* (หน้า 34-102). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

วิรัตน์ นิวัฒนนันท์, กนกพร นิวัฒนนันท์, สุนีย์ จันทร์สกาว และวรรณดี แต้โสตถิกุล. (2547). *ฤทธิ์ระงับการอักเสบของน้ำมันระเหยง่ายและสารสกัดจากพืชหอมไทยบางชนิด*. รายงานการวิจัย, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อนันต์ สกุลกิม. (2551). อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, *8*(1), 28-33.

อัญชนา เจนวิถีสุข. (2544). *การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. de Pharmacie de Belgique*, *49*, 462-468.

Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., & Atangbayila, T.O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(3), 1019-1024.

Bazylko, A., Piwowarski, J.P., Filipek, A., Bonarewicz, J., & Tomczyk, M. (2013). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta* and its main ellagitannin, agrimoniin.m. *Journal of Ethnopharmacology*, *149*, 222-227.

Braca, A., Sortion, C., Politi, M., Morelli, I., & Meddez, J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from Liccania licaniaeflora. *Journal of Ethnopharmacology*, *79*(3), 379-381.

Daduang, J., Vichitphan, S., Daduang, S., Hongsprabhas, P., & Boonsiri, P. (2011) High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *5*(5), 608-615.

Hasanuzzaman, Md., Ali, Md.R., Hossain, M., Kuri. S., & Islam, Md.S. (2013). Evaluation of total phenolic content, free radical scavenging activity and phytochemical screening of different extracts of *Averrhoa bilimbi* (fruit). *International Current Pharmaceutical Journal*, *2*(4), 92-96.

Majhenic, L., Skerget, M., & Knez , Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of quarana seed extracts. *Food Chemistry*, *104*(3), 1258-1268.

Pancharoen, O., & Klomkaew, R. (2010). A New Cyclohexylethanoid from *Dolichandrone serrulata*. *The 1st Kamphang-Saen International Natural Product Symposium The Relationship Between Living Organisms and Environment*, 157-162.

Phomkaivon, N., & Areekul, V. (2009). Screening for antioxidant activity in selected Thai wild plants. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, *2*(04), 433-440.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, *269*, 337-341.

Radhika, S., Senthilkumar, R., & Arumugam, P. (2014). Appraisal of in vitro Antioxidant propective of Premna corymbosa. *International Research Journal of Biological Science*, *3*(10), 70-75.

Shyam-Krishnan, M., Dhanalakshmi, P., Yamini, S.G., Gopalakrishnan, S., Manimaran, A., Sindhu, S., Sagadevan, E., & Arumugam, P. (2013). Evaluation of phytochemical constituents and antioxidant activity of Indian medicinal plant *Hydnocarpus pentandra*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *5*(2), 453-458.

Siddiqui, S., Verma, A., Rather, A.A., Jabeen, F., & Meghvansi, M.K. (2009). Preliminary phytochemical analysis of some important medicinal and aromatic plants. *Advances in Biological Research*, *3*(5-6), 188-195.

Sinaphet, B., Noiarsa, P., Rujirawat, S., Otsuka, H., & Kanchanapoom, T. (2006). Dolichandroside, a new phenolic triglycoside from *Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem. *Journal of Natural Medicines*, *60*, 251-254.

Sombie, P.A.E.D., Hilou, A., Mounier, C., Coulibaly, A.Y., Kiendrebeogo, M., Millogo, J.F., & Nacoulma, O.G. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities from galls of Guiera senegalensis J.F. Gmel (Combretaceae). *Research Journal of Medicinal Plant*, *5*(4), 448-461.

Tappel, A.L. (1962). Lipoxidase. In: Colowick S.P., & Kaplan. N.O. Academic Press. *Methods in Enzymology*, *5*, 539-542.

Thummajitasakul, S., Tumchalee, L., Koolwong, S., Deetae, P., Kaewsri, W., & Lertsiri, S. (2014). Antioxidant and antibacterial potential of some Thai native plant extracts. *International Food Research Journal*, *21*(6), 2393-2398.

Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S.K., & Watal, G. (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(5), 539-542.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric

1.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

1.1.1 สารละลาย Folin-Ciocalteu โดยเจือจางเป็น 1:10 (v/v) ด้วยน้ำกลั่น

1.1.2 สารละลายโซเดียม คาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5% (w/v)

1.1.3 สารละลายมาตรฐานแกลลิก (Gallic acid) ที่มีความเข้มข้น 0.1 mg/mLในเมทานอล โดยชั่งกรดแกลลิก 0.1 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 100-0.19 µg /mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

1.1.4 สารละลายตัวอย่างในตัวทำละลายเมทานอล เข้มข้น 2.0 mg/mL

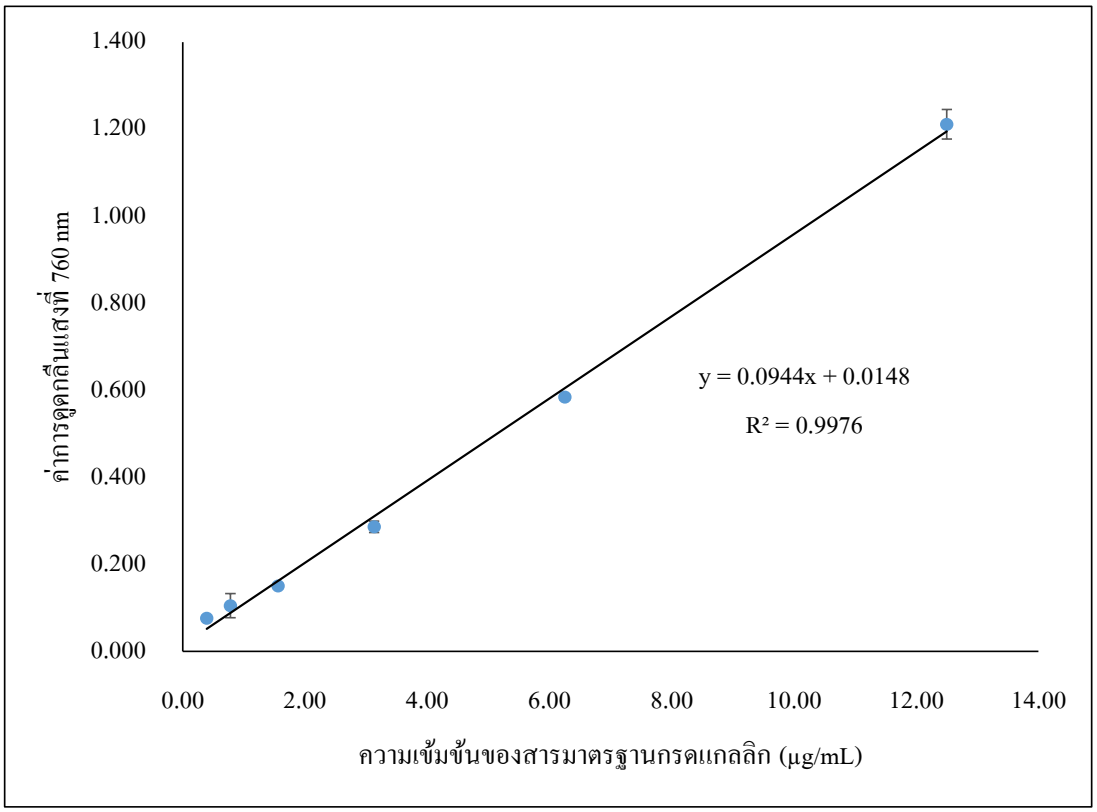
1.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

ผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 0.8 mL ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ปริมาตร 1.0 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, $mgGAE.g^{-1}$ dried extract)

1.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานแกลลิก ทำการหาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ก-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 760 nm			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.39	0.075	0.075	0.078	0.076	0.002
0.78	0.092	0.086	0.137	0.105	0.028
1.56	0.148	0.153	0.150	0.150	0.003
3.13	0.291	0.295	0.271	0.286	0.013
6.25	0.578	0.589	0.585	0.584	0.006
12.50	1.205	1.180	1.248	1.211	0.034



กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ได้สมการ $y = 0.0944x + 0.0148$, $R^2 = 0.9976$

ภาพที่ ก-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

1.4 ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ในหน่วย $mgGAE.g^{-1}$

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก คือ $y = 0.0944x + 0.0148$

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.346 จะได้ว่า

$$\begin{aligned} \text{จากสมการ} \quad y &= 0.0944x + 0.0148 \\ \text{แทนค่า} \quad y &= 0.346 \\ 0.346 &= 0.0944x + 0.0148 \\ x &= 3.51 \end{aligned}$$

ในสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 3.51 µgGAE

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ในหน่วย $mgGAE.g^{-1}$

สารสกัดตัวอย่าง 0.50 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก 3.51 µg

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก $\dfrac{3.51\ \mu gGAE \times 1{,}000\ mg}{0.50\ mg}$

$$= 7.02\ mgGAE.g^{-1}$$

เพราะฉะนั้น สารสกัดหยาบจากดอกของแคนา มีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ $7.02\ mgGAE.g^{-1}$

นำค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา

1.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

ตารางที่ ก-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

สารสกัดแคนา	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ดอก	0.50	0.346	0.362	0.372
ใบ	0.13	0.736	0.781	0.771
กิ่ง	0.50	0.727	0.800	0.779
ฝัก	0.50	0.432	0.492	0.495
เมล็ด	0.50	0.734	0.852	0.517

1.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนาในหน่วย $mgGAE.g^{-1}$

ตารางที่ ก-3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

สารสกัดแคนา	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ($mgGAE.g^{-1}$)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
ดอก	0.50	7.02	10.48	10.31	9.27	1.95
ใบ	0.13	61.12	64.93	64.08	63.38	2.00
กิ่ง	0.50	15.09	16.64	16.19	15.97	0.80
ฝัก	0.50	8.84	10.11	10.17	9.71	0.75
เมล็ด	0.50	15.24	17.74	10.64	14.54	3.60

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

2. ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric

2.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

2.1.1 สารละลาย Aluminum trichoride ($AlCl_3$) ความเข้มข้น 1.0 % (w/v) ในตัวทำละลายเมทานอล

2.1.2 สารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.1-0.0001 mg/mL โดยชั่งเคอร์ซิติน 0.1 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 100-0.19 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

2.1.3 สารละลายตัวอย่างในตัวทำละลายเมทานอล เข้มข้น 2.0 mg/mL

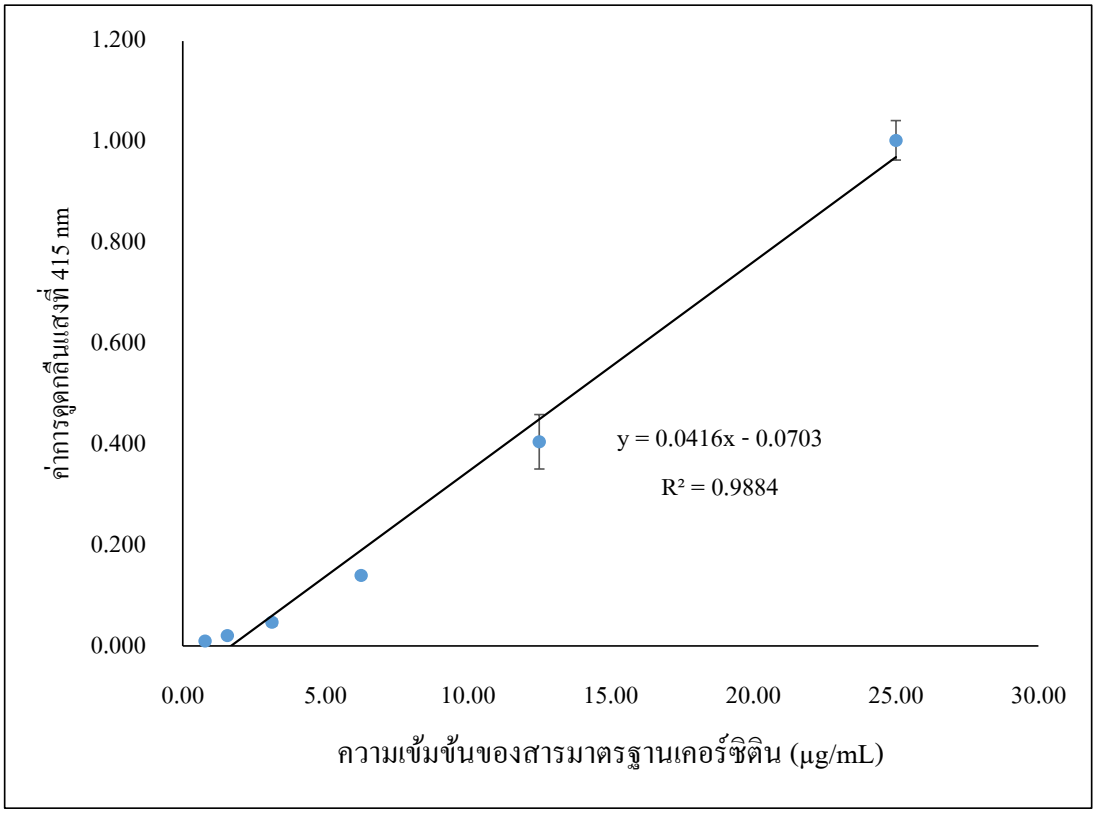
2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content)

ผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ปริมาตร 1.8 mL ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, $mgQE.g^{-1}$ dried extract)

2.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน ทำการหาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

ความเข้มข้นของเคอร์ซิติน (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.78	0.012	0.008	0.010	0.010	0.002
1.56	0.023	0.020	0.020	0.021	0.002
3.13	0.054	0.045	0.041	0.047	0.007
6.25	0.144	0.142	0.134	0.140	0.005
12.50	0.379	0.467	0.368	0.405	0.054
25.00	1.048	0.977	0.983	1.003	0.039



กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซิติน ได้สมการ $y = 0.0416x - 0.0703$, $R^2 = 0.9884$

ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน

2.4 ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ในหน่วย $mgQE.g^{-1}$

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซิติน คือ $y = 0.0416x - 0.0703$

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.043 จะได้ว่า

จากสมการ $y = 0.0416x - 0.0703$

แทนค่า $y = 0.043$

$0.043 = 0.0416x - 0.0702$

$x = 2.72$

ในสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 2.72 µgQE

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วย $mgQE.g^{-1}$

สารสกัดตัวอย่าง 1.00 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิติน 2.72 µgQE

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิติน $\frac{2.72\ \mu gQE \times 1{,}000\ mg}{1.00\ mg}$

$= 2.72\ mgQE.g^{-1}$

เพราะฉะนั้น สารสกัดหยาบจากดอกของแคนา มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ $2.72\ mgQE.g^{-1}$

นำค่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา

2.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

ตารางที่ ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

สารสกัดแคนา	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ดอก	1.00	0.043	0.050	0.055
ใบ	0.50	0.563	0.651	0.638
กิ่ง	1.00	-0.242	0.042	0.039
ฝัก	1.00	0.133	0.151	0.160
เมล็ด	1.00	0.138	-0.002	0.182

2.6 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบของแคนา ในหน่วย $mgGAE.g^{-1}$

ตารางที่ ข-3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

สารสกัดแคนา	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ($mgQE.g^{-1}$)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
ดอก	1.00	2.72	2.89	3.01	2.88	0.14
ใบ	0.50	30.45	34.68	34.05	33.06	2.28
กิ่ง	1.00	-4.13	2.70	2.63	2.66	0.05
ฝัก	1.00	4.89	5.32	5.54	5.25	0.33
เมล็ด	1.00	5.01	1.64	6.06	5.54	0.75

ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร และการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม

3. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity) ด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric

3.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

3.1.1 สารละลาย Phosphomolybdate reagent โดยผสมสารดังต่อไปนี้

1. 0.6 M sulfuric acid (H_2SO_4) ปริมาตร 100 mL
2. 4.0 mM ammonium molydate ปริมาตร 100 mL
3. 28.0 mM sodium phosphate (Na_3PO_4) ปริมาตร 100 mL

3.1.2 สารละลายมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 5.0 mg/mL โดยชั่งวิตามินซี 5.0 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.5-0.001 mg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

3.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 2.0 mg/mL ในเมทานอล

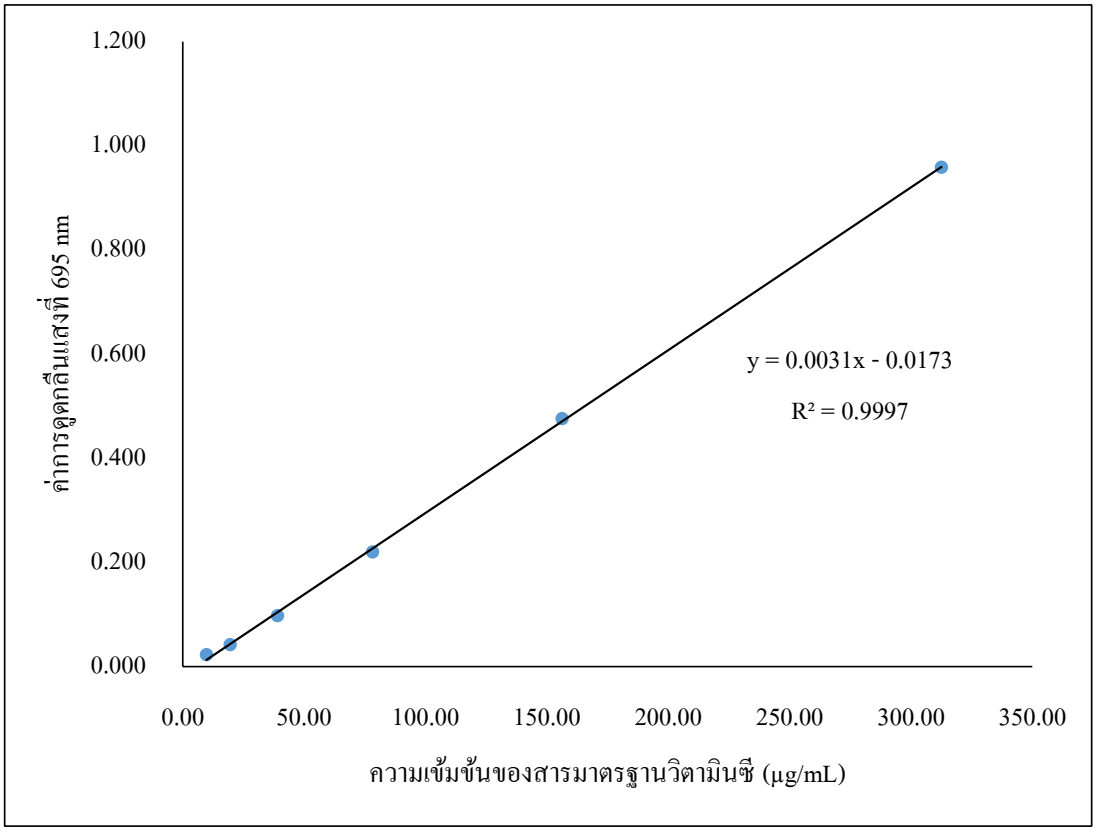
3.2 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant content)

ผสมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (ความเข้มข้น 0.5-0.01 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลาย Phosphomolybdate reagent ปริมาตร 1.8 mL ให้เข้ากัน บ่มบนเครื่องอังน้ำ ที่อุณหภูมิ 78 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานวิตามินซี ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Ascorbic acid equivalents, $mgAE.g^{-1}$ dried extract)

3.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำการหาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

ความเข้มข้นของวิตามินซี (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
9.77	0.021	0.024	0.024	0.023	0.002
19.53	0.040	0.043	0.044	0.042	0.002
39.06	0.099	0.095	0.101	0.098	0.003
78.13	0.216	0.222	0.222	0.220	0.003
156.25	0.484	0.473	0.471	0.476	0.007
312.50	0.957	0.968	0.951	0.959	0.009



กราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินซี ได้สมการ $y = 0.0031x - 0.0173$, $R^2 = 0.9997$

ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานวิตามินซี

3.4 การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ในหน่วย $mgAE.g^{-1}$

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินซี คือ $y = 0.0031x - 0.0173$

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.289 จะได้ว่า

จากสมการ $y = 0.0031x - 0.0173$

แทนค่า $y = 0.289$

$0.289 = 0.0031x - 0.0173$

$x = 98.81$

ในสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม เท่ากับ 98.81 µgAE

การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมในหน่วย $mgAE.g^{-1}$

สารสกัดตัวอย่าง 0.50 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี 98.81 µg

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี $\frac{98.81\ \mu gAE \times 1{,}000\ mg}{0.50\ mg}$

$= 197.61\ mgAE.g^{-1}$

เพราะฉะนั้น สารสกัดหยาบจากดอกของแคนา มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม เท่ากับ 197.61 $mgAE.g^{-1}$

นำค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ในสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา

3.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

ตารางที่ ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

สารสกัดแคนา	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ดอก	0.50	0.289	0.311	0.296
ใบ	0.25	0.526	0.555	0.544
กิ่ง	0.50	0.422	0.464	0.484
ฝัก	0.50	0.420	0.431	0.459
เมล็ด	0.25	0.659	0.697	0.726

3.6 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลของแคนา ในหน่วย $mgAE.g^{-1}$

ตารางที่ ค-3 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

สารสกัดแคนา	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ($mgAE.g^{-1}$)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
ดอก	0.50	197.61	211.81	202.13	203.85	7.25
ใบ	0.25	701.03	738.45	724.26	731.35	18.89
กิ่ง	0.50	283.42	310.52	323.42	305.78	9.12
ฝัก	0.50	282.13	289.23	307.29	292.88	12.97
เมล็ด	0.25	872.65	921.68	959.10	940.39	26.46

ภาคผนวก ง

การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดยวิธี DPPH free radical scavenging

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

4.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

4.1.1 สารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 mM (20 µg/mL) โดยชั่ง DPPH 10.0 mg ละลายในเมทานอล 500.00 mL

4.1.2 สารมาตรฐานกรดแกลลิก, เคอร์ซิติน และวิตามินซี ที่มีความเข้มข้น 1.0 mg/mL ในเมทานอล โดยชั่งสารมาตรฐานอย่างละ 0.1 mg ละลายในเมทานอล 1.0 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 2.0 - 0.016 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

4.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 mg/mL ในเมทานอล ปริมาตร 0.2 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 500.00-15.625 µg/mL

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH free radical scavenging

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 mg/mL) ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 1.8 mL ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)

4.3 ตัวอย่างการคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH free radical inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.282 (A) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.463 (B)

จากสมการ % DPPH free radical inhibition = [(A-B)/A] × 100

แทนค่า % DPPH free radical inhibition = [(0.463-0.282)/0.463] × 100

= 39.09

สารสกัดหยาบจากดอกของแคนาที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL ครั้งที่ 1 มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 39.09

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากดอกของแคนา

4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (Ascorbic acid)

ตารางที่ ง-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (μg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.02	0.438	0.431	0.431	2.67	4.22	4.22	3.70	0.90
0.03	0.419	0.423	0.423	6.89	6.00	6.00	6.30	0.51
0.06	0.396	0.397	0.400	12.00	11.78	11.11	11.63	0.46
0.13	0.369	0.364	0.367	18.00	19.11	18.44	18.52	0.56
0.25	0.315	0.323	0.305	30.00	28.22	32.22	30.15	2.00
0.50	0.253	0.244	0.250	43.78	45.78	44.44	44.67	1.02
1.00	0.035	0.110	0.144	92.22	75.56	68.00	78.59	12.39
2.00	0.023	0.021	0.021	94.89	95.33	95.33	95.19	0.26
Control (A)	0.446	0.451	0.454	(ค่าเฉลี่ย = 0.450)				

ตารางที่ ง-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

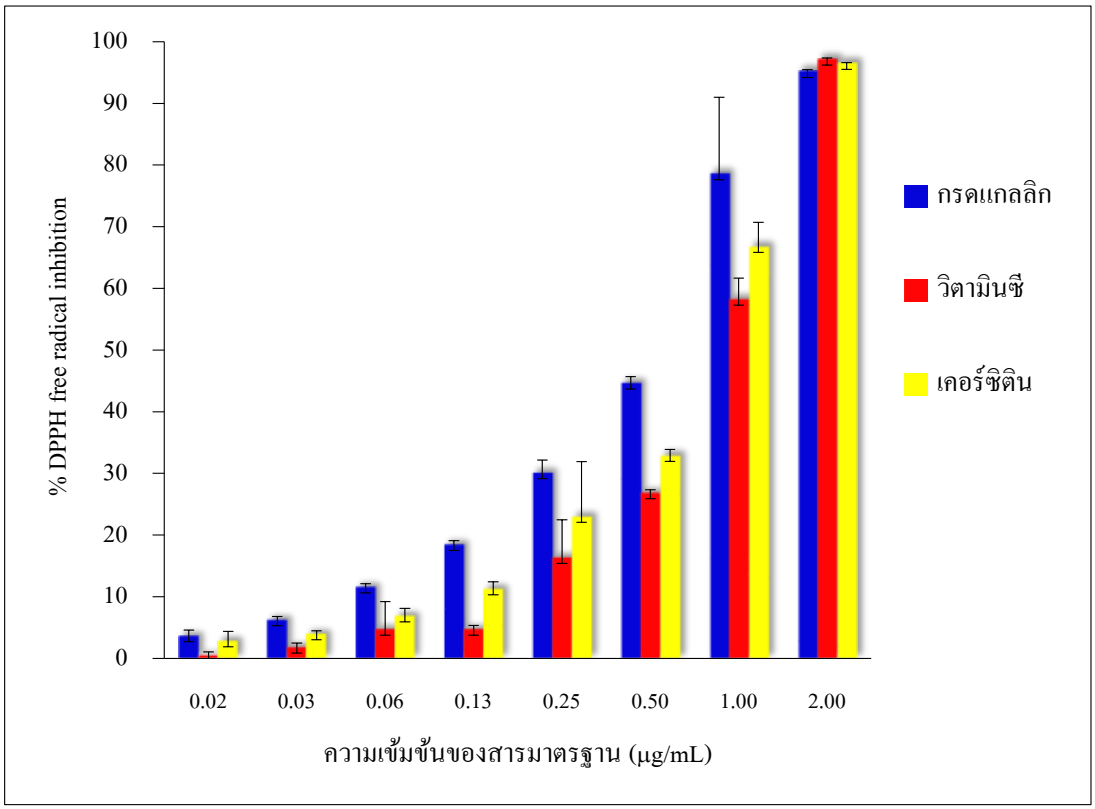
ความเข้มข้นของวิตามินซี (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.02	0.440	0.444	0.444	1.12	0.22	0.22	0.52	0.52
0.03	0.440	0.435	0.435	1.12	2.25	2.25	1.87	0.65
0.06	0.401	0.436	0.434	9.89	2.02	2.47	4.79	4.42
0.13	0.421	0.426	0.424	5.39	4.27	4.72	4.79	0.57
0.25	0.384	0.341	0.391	13.71	23.37	12.13	16.40	6.08
0.50	0.323	0.326	0.327	27.42	26.74	26.52	26.89	0.47
1.00	0.203	0.177	0.177	54.38	60.22	60.22	58.28	3.37
2.00	0.012	0.012	0.013	97.30	97.30	97.08	97.23	0.13
Control (A)	0.443	0.445	0.446	(ค่าเฉลี่ย = 0.445)				

ตารางที่ ง-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

ความเข้มข้นของเคอร์ซิติน (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.02	0.429	0.434	0.442	4.24	3.13	1.34	2.90	0.13
0.03	0.432	0.428	0.430	3.57	4.46	4.02	4.02	3.88
0.06	0.415	0.423	0.413	7.37	5.58	7.81	6.92	0.90
0.13	0.392	0.402	0.398	12.50	10.27	11.16	11.31	8.82
0.25	0.359	0.300	0.375	19.87	33.04	16.29	23.07	1.12
0.50	0.301	0.296	0.304	32.81	33.93	32.14	32.96	1.18
1.00	0.129	0.162	0.155	71.21	63.84	65.40	66.82	0.45
2.00	0.016	0.016	0.015	96.43	96.43	96.65	96.50	1.46
Control (A)	0.450	0.447	0.448	(ค่าเฉลี่ย = 0.448)				

ตารางที่ ง-4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน

ความเข้มข้น	% DPPH free radical inhibition		
(µg/mL)	กรดแกลลิก	วิตามินซี	เคอร์ซิติน
0.02	3.70 ± 0.90	0.52 ± 0.52	2.90 ± 1.46
0.03	6.30 ± 0.51	1.87 ± 0.65	4.02 ± 0.45
0.06	11.63 ± 0.46	4.79 ± 4.42	6.92 ± 1.18
0.13	18.52 ± 0.56	4.79 ± 0.57	11.31 ± 1.12
0.25	30.15 ± 2.00	16.40 ± 6.08	23.07 ± 8.82
0.50	44.67 ± 1.02	26.89 ± 0.47	32.96 ± 0.90
1.00	78.59 ± 12.39	58.28 ± 3.37	66.82 ± 3.88
2.00	95.19 ± 0.26	97.23 ± 0.13	96.50 ± 0.13



ภาพที่ ง-1 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซิติน

4.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

ตารางที่ ง-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
31.25	0.456	0.457	0.458	1.51	1.30	1.08	1.30	0.22
62.50	0.436	0.446	0.442	5.83	3.67	4.54	4.68	1.09
125.00	0.412	0.412	0.408	11.02	11.02	11.88	11.30	0.50
250.00	0.355	0.355	0.361	23.33	23.33	22.03	22.89	0.75
500.00	0.282	0.266	0.251	39.09	42.55	45.79	42.48	3.35
Control	0.465	0.466	0.467	(ค่าเฉลี่ย = 0.463)				

ตารางที่ ง-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
31.25	0.305	0.258	0.305	28.90	39.86	28.90	32.56	1.33
62.50	0.100	0.135	0.113	76.79	68.53	73.66	72.96	4.12
125.00	0.025	0.024	0.024	94.17	94.41	94.41	94.33	0.13
250.00	0.017	0.018	0.017	96.04	95.80	96.04	95.96	0.13
500.00	0.000	0.008	0.010	100.00	98.14	97.67	98.60	1.23
Control	0.430	0.428	0.430	(ค่าเฉลี่ย = 0.429)				

ตารางที่ ง-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากกิ่งแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
31.25	0.481	0.484	0.082	5.69	5.10	5.29	5.36	0.30
62.50	0.442	0.445	0.241	13.33	12.75	12.94	13.01	0.30
125.00	0.365	0.371	0.366	28.43	27.25	28.24	27.97	0.63
250.00	0.239	0.240	0.444	53.14	52.94	52.75	13.01	0.20
500.00	0.098	0.084	0.483	80.78	83.53	83.92	5.36	1.71
Control	0.504	0.514	0.511	(ค่าเฉลี่ย = 0.510)				

ตารางที่ ง-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากฝักแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
31.25	0.473	0.476	0.475	3.67	3.05	3.26	3.33	0.31
62.50	0.449	0.452	0.452	8.55	7.94	7.94	8.15	0.35
125.00	0.406	0.407	0.406	17.31	17.11	17.31	17.24	0.12
250.00	0.327	0.333	0.332	33.40	32.18	32.38	32.65	0.65
500.00	0.226	0.207	0.211	53.97	57.84	57.03	56.28	2.04
Control	0.490	0.490	0.493	(ค่าเฉลี่ย = 0.491)				

ตารางที่ ง-9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
31.25	0.448	0.453	0.453	2.18	1.09	1.09	1.46	0.63
62.50	0.433	0.437	0.438	5.46	4.59	4.37	4.80	0.58
125.00	0.404	0.404	0.401	11.79	11.79	12.45	12.01	0.38
250.00	0.330	0.331	0.325	27.95	27.73	29.04	28.24	0.70
500.00	0.273	0.246	0.249	40.39	46.29	45.63	44.10	3.23
Control	0.453	0.459	0.462	(ค่าเฉลี่ย = 0.458)				

ภาคผนวก จ

การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส

(Anti-lipoxidase assay)

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (Anti-lipoxidase assay)

5.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

5.1.1 การเตรียม Phosphate buffer pH 8.0 50 mM โดยผสมสารดังต่อไปนี้

A: เตรียม mono basic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$) 0.2 M

(stock A : ชั่ง NaH_2PO_4 15.601 g (MW = 156.01 g/mol) ละลายในน้ำ 500 mL)

B: เตรียม dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) 0.2 M

(stock B : ชั่ง Na_2HPO_4 17.799 g (MW = 177.99 g/mol) ละลายในน้ำ ปริมาตร 500 mL)

5.1.2 นำสารละลาย A ปริมาตร 10.60 mL และสารละลาย B ปริมาตร 189.40 mL มาผสมกัน วัด pH ให้ได้ 8.0 ถ้าไม่ได้ให้ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl เมื่อได้ pH 8.0 แล้วให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 mL (0.1 M) แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 mM

5.1.3 เอนไซม์ลิพอกซิเดส (Lipoxidase) 1000 U/mL โดยชั่งเอนไซม์ลิพอกซิเดสละลายใน 50mM phosphate buffer pH 8.0

5.1.4 สารละลายกรดลิโนเลอิก ความเข้มข้น 0.08 µM ในตัวทำละลาย 50 mM phosphate buffer pH 8.0 (เตรียมสารละลาย stock กรดลิโนเลอิก 3.2 µM: ปิเปตกรดลิโนเลอิก 5 µL ละลายในเอทานอล 4,500 µL แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.08 µM)

5.1.5 สารมาตรฐานเคอร์ซิติน ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 20 - 0.009766 mg/mL (เตรียมสารละลายเคอร์ซิติน 20 mg/mL: ชั่งเคอร์ซิติน 20 mg ละลายในเมทานอล 1.0 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 20 - 0.15 mg/mL)

5.1.6 สารละลายตัวอย่าง ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 20 - 0.3125 mg/mL

5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส (Lipoxidase)

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20 mg/mL) ปริมาตร 20 µL กับสารละลาย Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 120 µL และสารละลายเอนไซม์ลิพอกซิเดสความเข้มข้น 1000 U/mL ใน Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ปริมาตร 20 µL ลงในจานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) ความเข้มข้น 0.08 µM ปริมาตร 40 µL ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 50 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

5.3 ตัวอย่างการคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส (% Lipoxidase inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Lipoxidase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากดอกแคนา ที่ความเข้มข้น 2.0 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.208 (B) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.442 (A)

จากสมการ $\% \text{ Lipoxidase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$

แทนค่า $\% \text{ Lipoxidase inhibition} = [(0.442-0.208)/0.442] \times 100$

$= 52.94$

สารสกัดหยาบจากดอกแคนาที่ความเข้มข้น 2 mg/mL ครั้งที่ 1 มีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดส เท่ากับ 52.94

5.4 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน

ตารางที่ จ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

ความเข้มข้นของเคอร์ซิติน[a] (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm			% Lipoxidase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.001	0.113	0.111	0.110	0.88	2.63	3.51	2.34	1.34
0.002	0.107	0.109	0.105	6.14	4.39	7.89	6.14	1.75
0.004	0.094	0.093	0.095	17.54	18.42	16.67	17.54	0.88
0.008	0.084	0.086	0.083	26.32	24.56	27.19	26.02	1.34
0.016	0.070	0.072	0.070	38.60	36.84	38.60	38.01	1.01
0.031	0.056	0.058	0.056	50.88	49.12	50.88	50.29	1.01
0.063	0.045	0.047	0.045	60.53	58.77	60.53	59.94	1.01
Control (A)	0.117	0.113	0.112	(ค่าเฉลี่ย = 0.114)				

[a]: สารมาตรฐาน

5.5 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของแคนา

ตารางที่ จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากดอกแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm			% Lipoxidase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.03	0.436	0.437	0.436	1.36	1.13	1.36	1.28	0.13
0.06	0.429	0.431	0.428	2.94	2.49	3.17	2.87	0.35
0.13	0.413	0.411	0.412	6.56	7.01	6.79	6.79	0.23
0.25	0.382	0.381	0.381	13.57	13.80	13.80	13.73	0.13
0.50	0.337	0.338	0.336	23.76	23.53	23.98	23.76	0.23
1.00	0.273	0.273	0.271	38.24	38.24	38.69	38.39	0.26
2.00	0.208	0.209	0.209	52.94	52.71	52.71	52.79	0.13
Control (A)	0.439	0.442	0.444	(ค่าเฉลี่ย = 0.442)				

ตารางที่ จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm			% Lipoxidase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.03	0.270	0.268	0.269	44.56	44.97	44.76	44.76	0.21
0.06	0.184	0.181	0.181	62.22	62.83	62.83	62.63	0.36
0.13	0.121	0.120	0.119	75.15	75.36	75.56	75.36	0.21
0.25	0.053	0.052	0.053	89.12	89.32	89.12	89.19	0.12
0.50	0.031	0.011	0.017	93.63	94.46	94.87	94.32	0.63
1.00	0.013	0.011	0.017	97.33	97.74	96.51	97.19	0.63
2.00	0.006	0.0037	0.005	98.77	99.24	98.97	98.99	0.24
Control	0.491	0.484	0.486	(ค่าเฉลี่ย = 0.487)				

ตารางที่ จ-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากกิ่งแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm			% Lipoxidase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
0.03	0.175	0.172	0.173	34.94	36.06	35.69	35.56	0.57
0.06	0.116	0.114	0.116	56.88	57.62	56.88	57.13	0.43
0.13	0.064	0.063	0.060	76.21	76.58	77.70	76.83	0.77
0.25	0.035	0.037	0.038	86.99	86.25	85.87	86.37	0.57
0.50	0.021	0.020	0.023	92.19	92.57	91.45	92.07	0.57
1.00	0.013	0.011	0.013	95.17	95.91	95.17	95.42	0.43
2.00	0.001	0.002	0.004	99.63	99.26	98.51	99.13	0.57
Control	0.268	0.271	0.268	(ค่าเฉลี่ย = 0.269)				

ตารางที่ จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากฝักแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm			% Lipoxidase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.03	0.406	0.402	0.405	11.35	12.23	11.57	11.72	0.45
0.06	0.371	0.369	0.371	19.00	19.43	19.00	19.14	0.25
0.13	0.315	0.312	0.313	31.22	31.88	31.66	31.59	0.33
0.25	0.233	0.231	0.233	49.13	49.56	49.13	49.27	0.25
0.50	0.174	0.172	0.175	62.01	62.45	61.79	62.08	0.33
1.00	0.082	0.081	0.082	82.10	82.31	82.10	82.17	0.13
2.00	0.020	0.022	0.022	95.63	95.20	95.20	95.34	0.25
Control	0.458	0.460	0.456	(ค่าเฉลี่ย = 0.458)				

ตารางที่ จ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm และค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซิเดสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดแคนา

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm			% Lipoxidase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.03	0.269	0.266	0.267	4.61	5.67	5.32	5.20	0.54
0.06	0.250	0.250	0.253	11.35	11.35	10.28	10.99	0.61
0.13	0.194	0.196	0.195	31.21	30.50	30.85	30.85	0.35
0.25	0.142	0.139	0.143	49.65	50.71	49.88	49.88	0.74
0.50	0.086	0.087	0.086	69.50	69.15	69.39	69.39	0.20
1.00	0.041	0.042	0.041	85.46	85.11	85.34	85.34	0.20
2.00	0.016	0.014	0.012	94.33	95.04	95.04	95.04	0.71
Control	0.281	0.280	0.285	(ค่าเฉลี่ย = 0.282)				