

การทดสอบสารพิษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของปีบ

เรณู คำหอม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พฤษภาคม 2559


ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ เรณู คำหอม ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

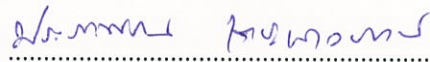
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธาน
(ดร.สุริย์พร หอมวิเศษวงศา)


.....กรรมการ
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)


.....กรรมการ
(ดร.ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัตน์ ศรีสุข)

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2559

ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ดร.อนันต์ อธิพรชัย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนให้กำลังใจ มาโดยตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่ได้สั่งสอนให้ความรู้ทั้งทฤษฎี และปฏิบัติการทางเคมี รวมทั้งปลูกฝังให้เป็นครูวิทยาศาสตร์ที่ดี และมีคุณภาพ

เนื่องจกงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถ พิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สกวท.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อบุญชู และคุณแม่สังวร คำหอม และสมาชิกในครอบครัวทุกคน รวมทั้งเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาวิชาเคมีศึกษา ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บุรพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและ ประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

เรณู คำหอม

56920137: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: ป๊อบ/ พฤษเคมี/ สารต้านอนุมูลอิสระ/ เอนไซม์ไทโรซิเนส/ แอล-ไทโรซีน/ แอล-โดปา

เรณู คำหอม: การทดสอบสารพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของป๊อบ

(PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Millingtonia*

hortensis) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อนันต์ อธิพรชัย, Ph.D. 102 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของป๊อบ (*Millingtonia hortensis*) จากการศึกษาสารพฤษเคมีของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของป๊อบ พบสารพฤษเคมีคือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ และสเตียรอยด์ นอกจากนี้ยังได้หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (19.87 ± 0.60 ถึง 48.85 ± 1.01 mgGAE/g) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (11.05 ± 2.48 ถึง 92.25 ± 9.15 mgQE/g) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (326.83 ± 9.72 ถึง 665.00 ± 20.53 mgAE/g) และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของป๊อบแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ที่ความเข้มข้น $250.00 \mu\text{g/mL}$ ($95.93 \pm 0.21\%$) และจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของป๊อบ โดยใช้ L-Tyrosine และ L-DOPA เป็นซับสเตรต พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของฝักส่วนในและเมล็ดของป๊อบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด เมื่อใช้ซับสเตรตเป็น L-Tyrosine ($96.73 \pm 0.23\%$ และ $96.02 \pm 0.44\%$) และ L-DOPA ($36.39 \pm 0.70\%$ และ $45.54 \pm 0.45\%$) จากผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรตพบว่า ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในและเมล็ดของป๊อบมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ($95.36 \pm 0.47\%$) จากผลดังกล่าวข้างต้นพบว่าสามารถพัฒนาและนำส่วนต่าง ๆ ของป๊อบไปใช้ประโยชน์ทางยาหรือเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อีกด้วย

56920137: MAJOR: CHEMISTRY EDUCATION; M.Sc. (CHEMISTRY EDUCATION)

KEYWORDS: *MILLINGTONIA HORTENSIS* / PHYTOCHEMICAL SCREENING,
ANTIOXIDANT/ TYROSINASE/ L-TYROSINE/ L-DOPA

RENU KHUMHOM: PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOLOGICAL
ACTIVITIES OF *Millingtonia hortensis*. ADVISORY COMMITTEE: ANAN ATHIPORNCHAI,
Ph.D. 102 P. 2016.

The present study was performed to evaluate the phytochemical screening and biological activities of the ethanolic extracts from several parts of *Millingtonia hortensis*. The phytochemical studies of the ethanolic extracts from this plant revealed that the presence of secondary metabolites of flavonoids, coumarins, tannins, terpenoids, and steroids. The ethanolic extracts were used to determine total phenolic content (19.87 ± 0.60 to 48.86 ± 1.01 mgGAE/g), total flavonoids content (11.05 ± 2.48 to 92.25 ± 9.15 mgQE/g) and total antioxidant capacity (326.83 ± 9.72 to 665.00 ± 20.53 mgAE/g). The highest antioxidant activity at 250 μ g/mL using DPPH free radical scavenging method was demonstrated by *M. hortensis* seeds extract ($95.50 \pm 0.21\%$). In addition, the ethanolic extracts of several parts from *M. hortensis* were evaluated for anti-tyrosinase activities using L-tyrosine and L-DOPA substrates. From these results, it was found that the ethanolic extracts of inner-pods and seeds from *M. hortensis* showed the both highest anti-tyrosinase activities at 1.00 mg/mL using L-tyrosine ($96.73 \pm 0.23\%$ and $96.02 \pm 0.44\%$) and L-DOPA ($36.39 \pm 0.70\%$ and $45.54 \pm 0.45\%$) substrates. From L-tyrosine substrate, it was found that the ethanolic extracts of inner-pods and seeds from *M. hortensis* showed more active than kojic acid ($95.36 \pm 0.47\%$), as the standard drug. Fortunately, these results suggest the potential of several parts from *M. hortensis* as medicine or cosmetic agents against free radical-associated oxidative damage.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฐ
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 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของปีบ.....	4
2.2 การเตรียมสกัดจากพืช	5
2.3 การเลือกวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช	6
2.4 การเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญจากพืช.....	7
2.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น	7
2.6 กลุ่มของสารสำคัญในสมุนไพรมะนาว	8
2.7 สารประกอบฟีนอลิก.....	13
2.8 อนุพลีอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	14
2.9 เอนไซม์ไทโรซิเนสและกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	15
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	24
3.2 แผนการดำเนินการวิจัย	26
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	32
4.1 การสกัดส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของปีบ	32
4.2 การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์เบื้องต้น	33
4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม	34
4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม	36
4.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม	38
4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging	40
4.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรต	43
4.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต	46
5 สรุปผลการวิจัย.....	50
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	50
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	51
บรรณานุกรม	52
ภาคผนวก	55
ภาคผนวก ก.....	56
ภาคผนวก ข.....	58
ภาคผนวก ค.....	63
ภาคผนวก ง	68
ภาคผนวก จ	73
ภาคผนวก ฉ	82
ภาคผนวก ช.....	92
ประวัติย่อของผู้วิจัย	102

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	ค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นของปีปในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ 17
2-2	ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในข้าวโพด ด้วยส่วนสกัดหยาบชั้นน้ำของใบปีป 18
2-3	ผลผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดหยาบชั้นน้ำจาก เปลือกลำต้นของปีป ด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema 19
2.4	ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบ ลำต้น ราก และดอกของปีป 20
4-1	น้ำหนักส่วนสกัดหยาบและร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีป 33
4-2	การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปีป 34
4-3	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน กรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซีติน 41
4-4	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจาก ส่วนต่าง ๆ ของปีป..... 42
4-5	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารมาตรฐาน กรดโคจิก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีป โดยใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรต..... 44
4-6	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารมาตรฐาน กรดโคจิก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีป โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต..... 46
ก-1	น้ำหนักของส่วนต่าง ๆ ของปีป น้ำหนักส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล และร้อยละผลผลิต 57
ข-1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก 60

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปีบ	61
ข-3 ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปีบ	62
ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน	65
ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปีบ	66
ค-3 ค่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปีบ	67
ง-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสารมาตรฐานวิตามินซี.....	70
ง-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ.....	71
ง-3 ค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปีบ	72
จ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก	75
จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐานวิตามินซี	76
จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน	76
จ-4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซีติน.....	77
จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ.....	78
จ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบของปีบ	79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากกิ่งของปีบ.....	79
จ-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในของปีบ	80
จ-9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนนอกของปีบ	80
จ-10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของปีบ.....	81
ฉ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต	85
ฉ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ	86
ฉ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบของปีบ	87
ฉ-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากกิ่งของปีบ	88
ฉ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในของปีบ.....	89
ฉ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนนอกของปีบ.....	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของป๊อบ	91
ช-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต	95
ช-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของป๊อบ	96
ช-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบของป๊อบ	97
ช-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากกิ่งของป๊อบ	98
ช-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในของป๊อบ.....	99
ช-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนนอกของป๊อบ.....	100
ช-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของป๊อบ	101

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปืบ.....	5
2-2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแบบต่าง ๆ.....	6
2-3 ตัวอย่างของสารในกลุ่มแอลคาลอยด์.....	9
2-4 สูตรโครงสร้างของสารประกอบไกลโคไซด์.....	9
2-5 ตัวอย่างของสารในกลุ่มไกลโคไซด์.....	10
2-6 ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์.....	11
2-7 ตัวอย่างของสารในกลุ่มแอนทราควิโนน.....	11
2-8 ตัวอย่างของสารในกลุ่มคูมาริน.....	12
2-9 ตัวอย่างของสารในกลุ่มซาโปนิน.....	12
2-10 ตัวอย่างของสารในกลุ่มแทนนิน.....	13
2-11 ปฏิบัติการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH.....	15
2-12 ขบวนการชีวสังเคราะห์เม็คดีเมลานินจากไทโรซีน.....	16
2-13 สูตรโครงสร้างของ Hispidulin.....	21
2-14 โครงสร้างของสารในกลุ่ม Cyclohexylethanoids ที่แยกได้จากดอกปืบ.....	21
2-15 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากดอกปืบ.....	22
2-16 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากก้านดอกปืบ.....	23
3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย.....	26
4-1 ลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ.....	32
4-2 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก.....	35
4-3 ปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ.....	36
4-4 กราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน.....	37
4-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ.....	38
4-6 กราฟมาตรฐานวิตามินซี.....	39
4-7 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปืบ.....	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-8 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซีติน	39
4-9 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH free radical inhibition) ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ	43
4-10 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน กรดโคจิก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ โดยใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรต	45
4-11 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน กรดโคจิก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต	47
4-12 การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ของ Tyrosine ไปเป็น DOPA ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากปีบ	48
ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก	60
ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน	65
ง-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานวิตามินซี	70
จ-1 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ของกราฟมาตรฐานกรดแกล วิตามินซี และเคอร์ซีติน	77
ฉ-1 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต	85
ช-1 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต	95

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความชราของผิวหนังส่งผลให้เกิดริ้วรอย จุดด่างดำ และผิวหมองคล้ำ ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพจิตและบุคลิกภาพอย่างมาก การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนอกจากมีสาเหตุมาจากความเสื่อมโทรมตามธรรมชาติแล้ว อีกสาเหตุที่สำคัญคือ มลภาวะต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น ความเครียด อาหารที่รับประทาน สารเคมี มลพิษทางอากาศ รวมทั้งรังสีและความร้อนจากแสงแดด สิ่งเหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกายขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง รวมทั้งการเกิดริ้วรอยก่อนวัย และยังกระตุ้นให้มีการผลิตเม็ดสีเมลานินที่มากเกินไปทำให้ผิวหมองคล้ำ เกิดฝ้า และกระบนผิวหนังอีกด้วย (กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เขียวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2553) ดังนั้นในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางส่วนใหญ่จึงมักมีการใส่สารทำให้ผิวขาว สารทำให้ผิวขาวที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น สารปรอทและไฮโดรควิโนน แต่ปัจจุบันเป็นสารห้ามใช้ในเครื่องสำอาง เนื่องจากมีผลข้างเคียง โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้เป็นเวลานาน ๆ จะทำให้เกิดฝ้า ทำให้ผู้ใช้เกิดการแพ้แสงง่าย เกิดมะเร็ง หรือบางครั้งอาจก่อให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ (พอใจ รัตนปนัดดา, 2553) ทำให้ผู้คนหันมาสนใจผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งจะช่วยทำให้ผิวขาวขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (วรินดา นันดา และสุภัชญา มั่นอิม, 2546)

ดังนั้นการศึกษาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงน่าจะเป็นแนวทางในการเลือกใช้สมุนไพรและช่วยในการดูแลสุขภาพผิวพรรณได้ ซึ่งประเทศไทยมีพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก และหาได้ง่าย อาทิเช่น ปิบ (*Millingtonia hortensis*) ที่มีรายงานสรรพคุณต่าง ๆ ที่ใช้ในตำรายาโบราณ เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด รักษาหอบหืด ไชน์สอ๊กเสบ และบำรุงโลหิต (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553) แต่ยังไม่มียารายงานเกี่ยวกับการนำส่วนต่าง ๆ ของปิบไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสรรพคุณเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากส่วนต่าง ๆ ของปิบ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อลดริ้วรอยและบำรุงผิวขาวต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด
2. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด
3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เตรียมส่วนสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของปีบทั้ง 6 ส่วน ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด โดยใช้วิธีการสกัดแบบแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล
2. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด แบ่งการทดสอบเป็น 9 กลุ่ม คือ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และซาโปนิน
3. หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด
4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด
2. ทำให้ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด
3. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

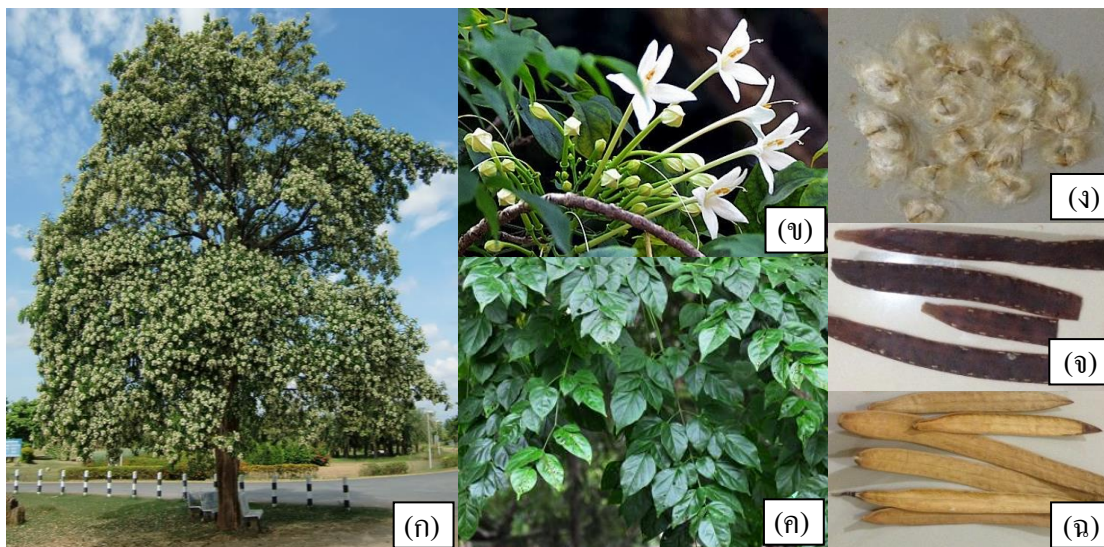
1. สมุนไพร ตามพระราชบัญญัติยาจะตรงความหมายกับคำว่า Crude Drugs ซึ่งหมายถึง "ยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ธาตุ ที่ยังไม่ได้ผสมปรุง หรือแปรสภาพ" ดังเช่น ถ้าได้จากพืชก็ยังเป็นส่วนของ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งยังไม่ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใด ๆ
2. สารสกัดหยาบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงหรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะนำไปใช้ประโยชน์
3. องค์กรประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชโดยใช้ระยะเวลาสั้น ทำได้ง่าย รวดเร็ว และใช้เครื่องมือที่น้อยที่สุด โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีง่ายๆ หรือใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี (Color reaction) ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่าง ๆ หรือเกิดตะกอน เพื่อบอกถึงกลุ่มสารเคมีที่สำคัญและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และซาโปนิน
4. ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) คือ กิจกรรมชีวสาร ปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือสมบัติทางชีวภาพที่เกิดขึ้นและเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของปีบ (*Millingtonia hortensis*)

ปีบ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Millingtonia hortensis* อยู่ในวงศ์ Bignoniaceae มีชื่อสามัญ Cork tree หรือ Indian Cork ชื่ออื่น ๆ เช่น กาสะลอง กาดสะลอง (ภาคเหนือ) เต็กตองโพ (กาญจนบุรี) กางของ (ภาคอีสาน) (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553) เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ผลัดใบ ลำต้นตรง สูงได้ถึง 25 เมตร เปลือกต้นหนาสีน้ำตาลอ่อนปนเทาแตกเป็นร่องลึก (ภาพที่ 2-1) ใบ เป็นใบประกอบแบบขน 2-3 ชั้น ออกเรียงสลับ มีใบย่อย 4-6 คู่ ใบรูปใบหอกแกมรูปไข่ ปลายใบแหลม โคนใบมน ขอบหยักเป็นซี่หยาบ แผ่นใบเรียบทั้งสองด้าน เนื้อใบบางคล้ายกระดาษ ดอกออกเป็นช่อขนาดใหญ่ที่ปลายกิ่ง มีดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีขาว มีกลิ่นหอม กลีบดอกมี 5 กลีบ โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ปลายกลีบแหลมแยกเป็นหลอดปากแตร 5 แฉก กลีบเลี้ยงสีเขียว โคนเชื่อมติดกัน วงกลีบเลี้ยงรูปถ้วย ปลายแยกเป็น 5 แฉก เกสรเพศผู้อยู่ชิดกับกลีบดอกมีจำนวน 4 อัน แบ่งเป็นสองคู่ ยาวไม่เท่ากัน ผลเป็นฝักแบน ยาวแคบ รูปขอบขนาน ยาว 30-40 เซนติเมตร ปลายฝักแหลม ฝักอ่อนสีเขียว มีเนื้อ พอแก่ฝักจะมีสีน้ำตาลแห้งแข็ง เมื่อแตกออกจะแบ่งได้เป็น 2 ซีก ภายในมีฝักส่วนในสีดำอยู่ตรงกลาง และเมล็ดเป็นจำนวนมาก มีลักษณะแบนรูปหยดน้ำมีปีกสีขาวค่อนข้างบางใสอยู่โดยรอบเมล็ด ยกเว้นบริเวณส่วนปลายเมล็ดด้านแหลม ออกดอกช่วงเดือนกันยายนถึง ธันวาคม ติดผลช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์ ปีบมีสรรพคุณตามตำรายาไทยหลายอย่าง เช่น ดอกมีรสหวานขม ขยายหลอดลม มวนเป็นบุหรี่ยสูบทำให้ปากหอม รักษาหืด แก้วริดสีดวงจมูก ไช้นัส อักเสบ บำรุงน้ำดี เพิ่มการหลั่งน้ำดี บำรุงโลหิต บำรุงกำลัง แก้กลม รากมีรสเฝื่อน บำรุงปอด แก้กหอบ แก้วณโรคและโรคปอด แก้วไอ แก้วเหนื่อหอบ เปลือกใช้แก้วไอ ขับเสมหะ ส่วนใบใช้มวนเป็นบุหรี่ยสูบช่วยขยายหลอดลม ใช้รักษาอาการหอบหืด



ภาพที่ 2-1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปีบ: (ก) ต้นปีบ (ข) ดอก (ค) ใบ (ง) เมล็ด (จ) ฝักส่วนใน (ฉ) ฝักส่วนนอก (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553)

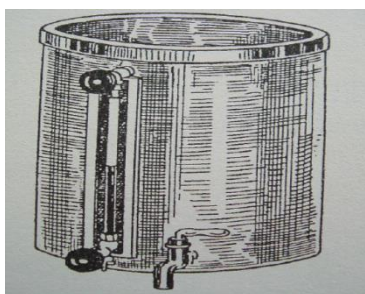
2.2 การเตรียมสกัดจากพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชต้องคำนึงถึงสารสำคัญในพืช คือการตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นเจือปน ไม่มีโรคพืช อายุพืชที่ผลิตสารสำคัญ และการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างให้แห้ง เพื่อคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและอุณหภูมิต่ำ ๆ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลง ในการสกัดเพื่อแยกสารสำคัญจากพืชเพื่อนำมาศึกษานั้น มีด้วยกันหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้ทั่ว ๆ ไปได้แก่วิธีดังต่อไปนี้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

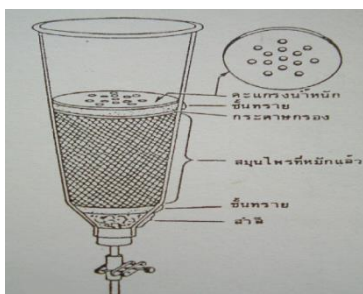
2.2.1 วิธีการหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักพืชกับตัวทำละลายในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทจนเนื้อเยื่อของพืชอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบในพืชออกมาได้ วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.2.2 วิธีการแช่สกัดต่อเนื่อง (Percolation) เป็นวิธีปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงพืชสมุนไพรซ้ำ ๆ พร้อมกับละลายส่วนที่เป็นองค์ประกอบออกจากผงพืชสมุนไพรออกมาโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolation ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นการสกัดสารจากพืชได้สมบูรณ์และไม่ใช้ความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและใช้เวลานานในการสกัดนาน

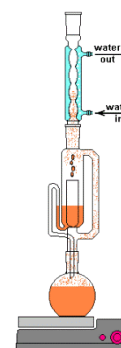
2.2.3 การสกัดด้วย Soxhlet Extraction เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลาย ซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน Flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับ สารสกัด จะไหลกลับลงไปใน Flask ด้วยวิธีการกลั่นตัว Flask นี้ได้รับความร้อนจาก Heating mantle หรือ หม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทั้งสารสกัดไว้ใน Flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ Condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้มี ข้อดีคือ ใช้ตัวทำละลายน้อย แต่ใช้ความร้อนด้วย จึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัวได้



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 2-2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแบบต่าง ๆ: (ก) Maceration (ข) Percolation

(ค) Soxhlet Extraction (เข้าถึงได้จาก: http://science.psu.ac.th/teaching/data/chem/Extraction_and_Isolation_of_Natural_Products.pdf)

2.3 การเลือกวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช (รัตน อินทรานุปกรณ์, 2547)

วิธีการสกัดพืชที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่

2.3.1 ธรรมชาติของพืช โดยพิจารณาจากลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อพืชที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธีวิธีการหมัก หากเป็นพืชที่มีเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีการแช่สกัดต่อเนื่องหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง ถ้าสารสำคัญในพืชเป็นสารที่ละลายได้ง่ายนิยมใช้วิธีการหมัก แต่ถ้าละลายได้น้อยจำเป็นต้องใช้วิธีการแช่สกัดต่อเนื่องหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง นอกจากนี้ต้องพิจารณาความคงตัวของสารสำคัญในพืชสมุนไพรต่อความร้อนด้วย ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีการหมักหรือวิธีการแช่สกัดต่อเนื่อง

2.3.2 คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญ และมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่าง ๆ ก็อาจใช้วิธีง่าย ๆ ที่

ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

2.3.3 ความต้องการที่จะให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดที่เจือจางการใช้วิธีการหมักก็เพียงพอ แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีการแช่สกัดต่อเนื่องหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.4 การเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญจากพืช

ทำละลายที่เหมาะสมควรเป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีพอ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด ราคาไม่แพงมาก ในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์คือ สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ในขณะที่สารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เฮกเซน และแอลกอฮอล์ เป็นต้น

2.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration) (รัตน อินทรานุปกรณ์, 2547)

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากวิธีการสกัดข้างต้น สารสกัดที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพจึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.5.1 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuum) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่กลั่น (Distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์ หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (Condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังกลั่น (Receiving flask) โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่อยู่ในเครื่องอ่างน้ำ (Water bath) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (Rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้ต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่น ที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำหีบรีสุทซ์และนำกลับใช้ได้

2.5.2 การระเหย (Free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกโดยใช้ความร้อนจากเครื่องอังน้ำ (Water bath) หรือแผ่นความร้อน (Hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ในสารสกัดการระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (Direct heat) บนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญเมื่อให้ความร้อน

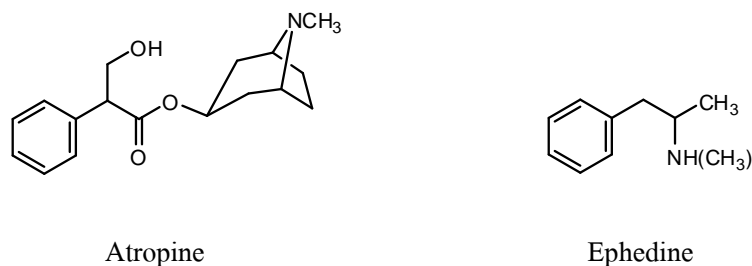
2.5.3 การแช่แข็ง (Freezing) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำ เหมาะที่จะแช่แข็งโดยใช้ความเย็น (Lyophilizer หรือ Freeze dryer)

2.5.4 อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยการใช้แผ่นเมมเบรน (Membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) สูงกว่า 5,000

2.6 กลุ่มของสารสำคัญในสมุนไพร (รัตน อินทรานุปกรณ์, 2547)

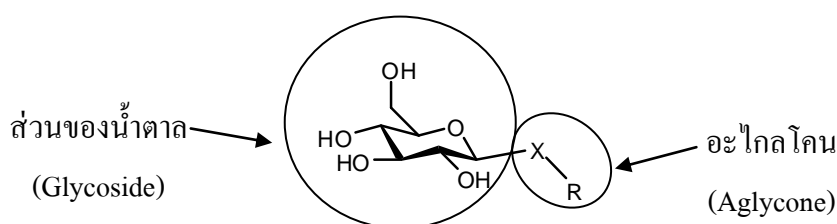
สารสำคัญในพืชมีจำนวนมาก สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) โดยสารปฐมภูมิเป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมที่จำเป็นของเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) ไขมัน (Lipids) โปรตีน (Protien) เอนไซม์ (Enzymes) น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil หรือ Essential oil) ส่วนสารทุติยภูมิ เป็นสารประกอบที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ในพืชเป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดและแต่ละฤดู สารเหล่านี้จะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน สารทุติยภูมิมียุทธวิธี ได้แก่

2.6.1 แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย คุณสมบัติของแอลคาลอยด์คือ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ มีฤทธิ์เป็นด่าง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น อะโทรปีน (Atropine) ซึ่งสกัดได้จากต้นและใบของตำบอง (Datura metel L.) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ รวมทั้งอีเฟดริน (Ephedrine) ซึ่งสกัดได้จากต้นมั่วอึ้ง (Ephedra equisetina Bunge) มีฤทธิ์ขยายหลอดลมใช้เป็นยารักษาโรคหอบหืด เป็นต้น



ภาพที่ 2-3 ตัวอย่างของสารในกลุ่มแอลคาลอยด์

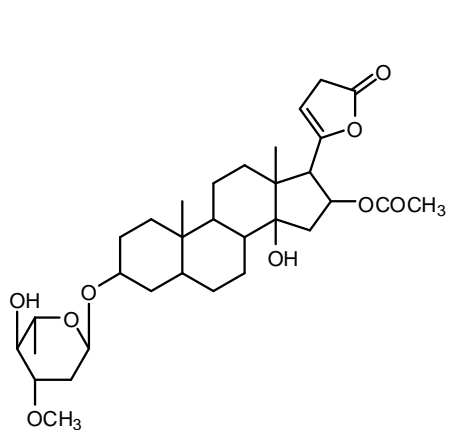
2.6.2 ไกลโคไซด์ (Glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลที่เรียกว่า อะไกลโคน (Aglycone) จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (Glycoside) ละลายน้ำได้ดี โครงสร้างของ Aglycone มีความแตกต่างกันหลายแบบทำให้ประเภทและสรรพคุณทางเภสัชวิทยาของไกลโคไซด์มีหลายชนิดที่ใช้เป็นยา



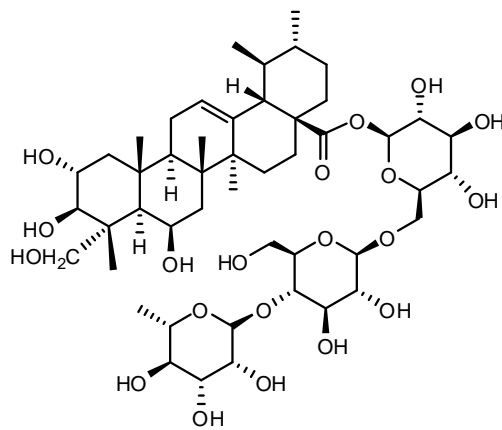
ภาพที่ 2-4 สูตรโครงสร้างของสารประกอบไกลโคไซด์

ไกลโคไซด์ จำแนกตามสูตรโครงสร้างของอะไกลโคน (Aglycone) ได้หลายประเภทคือ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) ตัวอย่างเช่น โอลิแอนดริน (Oleandrin) สกัดได้จากใบของยี่โถ (*Nerium indicum* Mill) ใช้บำบัดรักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Anthraquinone glycosides) ตัวอย่างเช่น บาบาลอีน (Barbaloin) สกัดได้จากใบว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis* Mill) ใช้เป็นยาขับถ่าย ซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) ตัวอย่างเช่น ไดออสซิน (Dioscin) เป็นสเตียรอยด์ดัดซาโปนิน (Steroidal saponins) สกัดได้จากเมล็ดลูกช้ด (*Trigonella foenum-graecum* L.) และมาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) เป็นไตรเทอร์พีนอยด์ซาโปนิน (Triterpenoid saponins) สกัดได้จากบัวบก (*Centella asiatica* L. Urban) มีฤทธิ์ทำให้แผลแห้งเร็ว รักษาแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ (Cyanogenic glycosides) ตัวอย่างเช่น โลทาสตราลิน (Lotaustralin) สกัดได้จากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ฟลาโวนอยด์

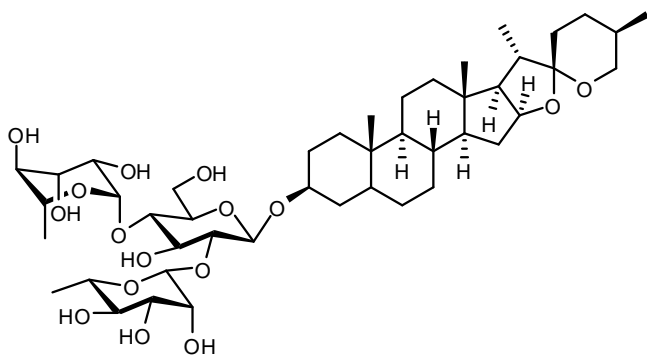
ไกลโคไซด์ (Flavonol glycosides) ตัวอย่างเช่น รุทีน (Rutin) พบในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.)
ใช้สำหรับเสริมสร้างผนังหลอดเลือดฝอย



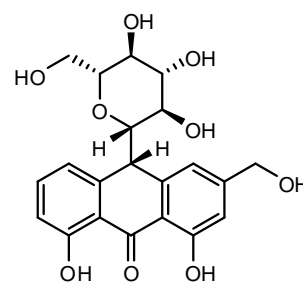
Oleandrin



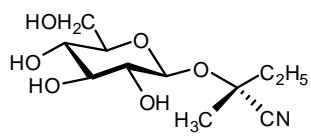
Madecassoside



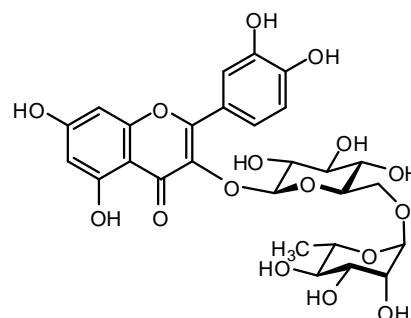
Dioscin



Barbaloin



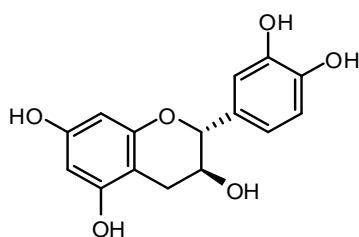
Lotaustralin



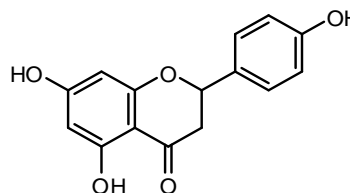
Rutin

ภาพที่ 2-5 ตัวอย่างของสารในกลุ่มไกลโคไซด์

2.6.3 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น ฟีนิลเบนโซไพโรน (Phenylbenzopyrones) ประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว ($C_6-C_3-C_6$) เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (Benzene ring) 2 วง (ซ้ายและขวา) เชื่อมต่อกับวงแหวนไพแรน (Heterocyclic pyran ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ตัวอย่างเช่น Catechin พบมากในใบชาเขียว (*Camellia sinensis*) และ Naringenin พบในเปลือกส้มโอ (*Citrus grandis* (L.) Osbeck)



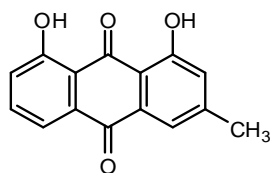
Catechin



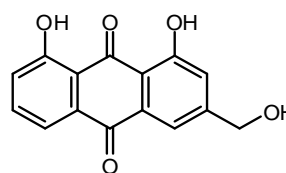
Naringenin

ภาพที่ 2-6 ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

2.6.4 แอนทราควิโนน (Anthraquinones) มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3 วงแหวน ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (benzene ring) 2 วง (ซ้ายและขวา) เชื่อมต่อกับวงควิโนน ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง เป็นสารที่มีสีแดง-ส้ม แต่อาจจะพบได้ตั้งแต่สีเหลืองน้ำตาล ส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบาย นอกจากนี้ใช้เป็นสีย้อม ยารักษาเชื้อราที่ผิวหนังอีกด้วย ตัวอย่างเช่น Chrysophanol พบในชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* (L.) Roxb.) และ Emodin พบในฝักกุ่ม (*Cassia fistula* L.)



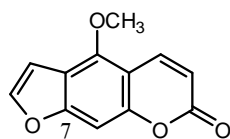
Chrysophanol



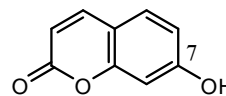
Emodin

ภาพที่ 2-7 ตัวอย่างของสารในกลุ่มแอนทราควิโนน

2.6.5. คูมาริน (Coumarin) เป็นแลคโตนของ O-hydroxy cinnamic acid ในพืชพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ คูมารินเกือบทั้งหมดในธรรมชาติจะมีออกซิเจนที่ตำแหน่งที่ C-7 (อาจพบในรูปของ Hydroxyl หรือ Alkoxy) สารบางตัวระเหยได้นำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น สารแต่งกลิ่น ยารักษาโรค รักษาริดดวงขาว ตัวอย่างเช่น Bergapten พบในใบหม่อน (*Morus alba* Linn.) และ Umbelliferone พบในส้มโอ (*Citrus grandis* (L.) Osbeck)



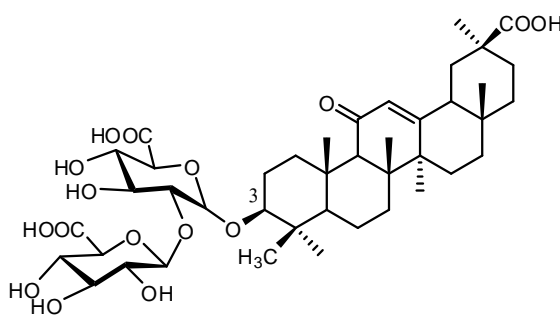
Bergapten



Umbelliferone

ภาพที่ 2-8 ตัวอย่างของสารในกลุ่มคูมาริน

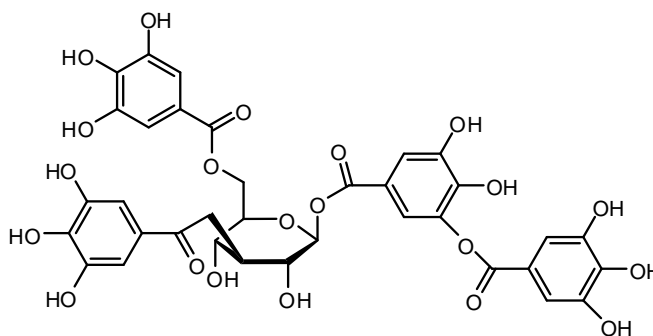
2.6.6 ซาโปนิน (Saponins) หรือซาโปนินไกลโคไซด์ มีส่วนอะไกลโคนเป็นสารพวก Steroids หรือ Triterpenoids ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C₃ ได้ เป็น O-glycoside ซาโปนินไกลโคไซด์มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี ตัวอย่างเช่น Glycyrrhizin พบในชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) ซึ่งมีอะไกลโคนเป็น Triterpenoids และมีโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุลเกาะตำแหน่งที่ 3



Glycyrrhizin

ภาพที่ 2-9 ตัวอย่างของสารในกลุ่มซาโปนิน

2.6.7 แทนนิน (Tannins) เป็นสารประกอบพวกฟีนอล สามารถละลายน้ำได้ เป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด มีโมเลกุลใหญ่ และโครงสร้างซับซ้อน มีสมบัติเป็นกรดอ่อน รสฝาด แทนนินใช้เป็นยาฝาดสมานและยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้ สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม (*Punica granatum* L.) เปลือกอบเชย (*Cinnamomum* spp.) ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) เป็นต้น ตัวอย่างเช่น Tannic acid



Tannic acid

ภาพที่ 2-10 ตัวอย่างของสารในกลุ่มแทนนิน

2.7 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) เป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืช มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต และป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็ง สารกลุ่มนี้ถูกจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ซึ่งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยเหล่านี้ที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหาร ยา และเครื่องสำอางอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) คือ สารที่มีสูตรโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) บนวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป

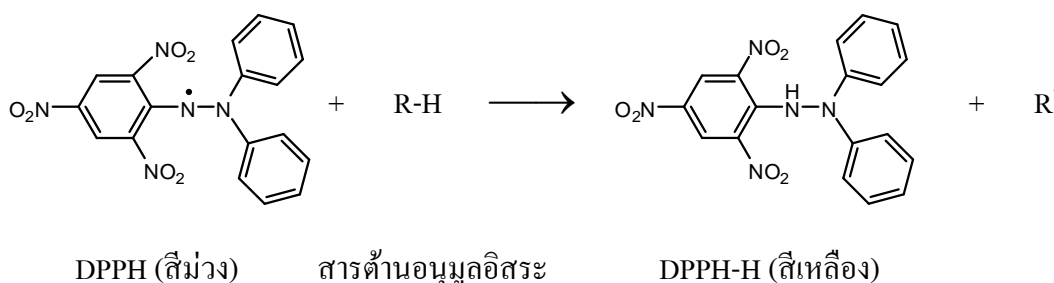
ปัจจุบันสารประกอบฟีนอลิกได้รับความสนใจในฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidation) และฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagenic activity) ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) และการใช้สารประกอบฟีนอลิกในการป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะ โรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลิก จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการ

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และ โมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้วจะกลายเป็นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลซึ่งค่อนข้างเสถียร ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับ อนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า สารประกอบฟีนอลิกที่ถูกรับว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ดผล และใบ (รุ่งฤดี ศรีสวัสดิ์, 2555)

2.8 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ (พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์, 2557)

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่รอบรัศมีวงนอกสุด และมีระดับพลังงานสูง รวมทั้งอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชัน ส่วนใหญ่ การที่อนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนเดี่ยวทำให้เป็นสารที่ไม่เสถียร ส่งผลให้อนุมูลอิสระมีคุณสมบัติคือ ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ โดยอนุมูลอิสระจะเข้าไปแย่งจับกับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่รอบข้าง ก่อให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากจะส่งผลต่อการทำลายระบบต่างๆ ในร่างกายให้เสียสมดุลและส่งผลเสียต่อเซลล์ รวมทั้งเป็นสาเหตุของความชราและโรคต่างๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ ไขข้ออักเสบ หรือโรคมะเร็ง เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระไว้ ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันต่างๆ ไม่เกิดขึ้น สามารถป้องกันเซลล์ผิวหนังจากการถูกทำลาย จึงใช้ป้องกันหรือชะลอความเหี่ยวย่นของผิวได้ โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบ ฟีนอลิก (Phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติ ร่างกายของคนเรา จะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือเบต้าแคโรทีน รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” ขึ้น ภายใต้อาการดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่างได้

วิธีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant assay) มีอยู่ด้วยกันมากมายหลายวิธี แต่มีอยู่หนึ่งวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ วิธี DPPH free radical scavenging assay โดยใช้อนุมูลอิสระที่เรียกว่า DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นได้ สารละลาย DPPH ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วงและจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้เปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสารละลายสีเหลืองและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ดังสมการ (จินดาพร คงเดช, 2551)

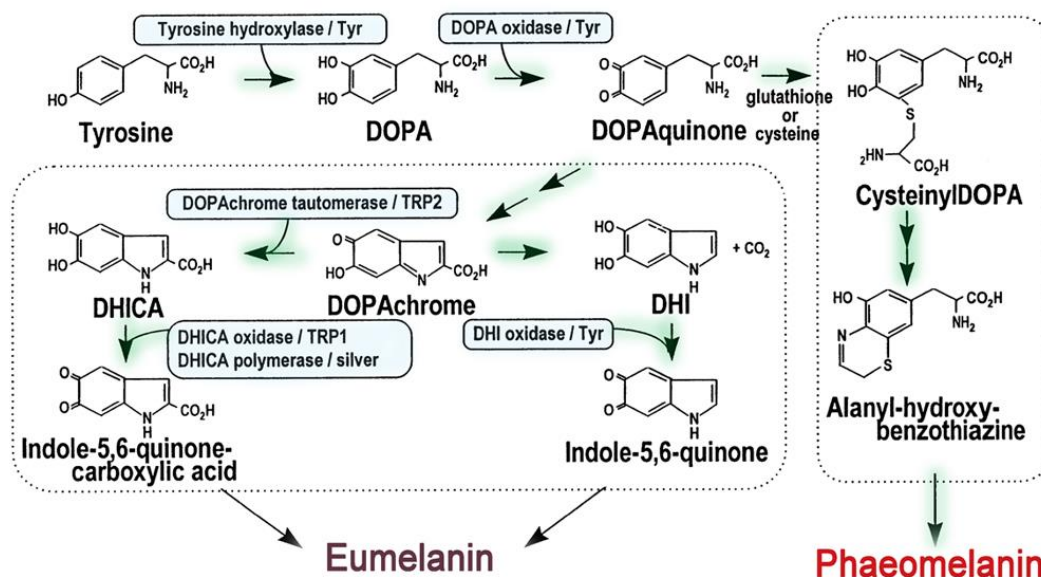


ภาพที่ 2-11 ปฏิกริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH

2.9 เอนไซม์ไทโรซิเนสและกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์โมโนออกซิเจเนสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (Copper monooxygenase enzyme) เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช เชื้อรา แมลง และสัตว์ ในคนพบเอนไซม์ไทโรซิเนสในเมลานโซม (Melanosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างสีน้ำตาลที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เมลานอไซต์ (Melanocyte) บริเวณชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า

เอนไซม์ไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนัง โดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน (Tyrosine) ไปเป็นสารโดปา (DOPA) ด้วยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน และเปลี่ยนโดปาไปเป็นโดปาคิวโนน (Dopaquinone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากนั้นโดปาคิวโนนจะถูกเปลี่ยนผ่านสารตัวกลางอีกหลายตัว จนเกิดโพลีเมอไรเซชันไปเป็นเม็ดสีเมลานินจนได้เม็ดสี 2 ชนิด คือ ชนิดสีดำ หรือสีน้ำตาล เรียกว่ายูเมลานิน (Eumelanin) และชนิดสีเหลืองหรือสีส้ม เรียกว่าฟีโอมเมลานิน (Pheomelanin) สัดส่วนของยูเมลานินและฟีโอมเมลานิน ในแต่ละคนจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อชาติและพันธุกรรม รวมถึงการได้รับรังสียูวีจากแสงแดด ส่งผลต่อการกระตุ้นการเกิดเม็ดสีเมลานินให้เพิ่มมากขึ้น (พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์, 2557)



ภาพที่ 2-12 ขบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินจากไทโรซีน

(เข้าถึงได้จาก: http://www.bio.miami.edu/dana/250/250SS13_6.html)

จากการศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้โดยจับกับสารที่เป็น Active site ของเอนไซม์ คือส่วนที่เป็น Cu^{2+} ซึ่งจะขัดขวางการเข้าจับกันระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จะเป็นสารประกอบพวก Aromatic acid, Aromatic aldehyde, Tropolone, Kojic acid และ Salicylic acid โดยโครงสร้างที่มีความเป็น Hydrophobic จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (นริศ คำแก่น, 2551)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 การศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบจากปืบ (*M. hortensis*)

Tansuwanwong, Yamamoto, Imai, and Vinitketkumnien (2007) รายงานการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ระหว่างส่วนสกัดหยาบชั้นน้ำและชั้นเอทานอลของเปลือกต้นปืบโดยใช้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด DLD-1, HCT15, SW48 และ SW480 ด้วยวิธี MTT assay พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นน้ำของเปลือกต้นปืบมีฤทธิ์ยับยั้งอัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ แต่ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลไม่สามารถยับยั้งอัตราการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

Nagaraja and Padmaa (2011) รายงานการศึกษาส่วนสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นของปืป (*M. hortensis*) ที่สกัดในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ด้วยวิธี Resazurin assay พบว่าส่วนสกัดหยาบที่สกัดในตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นของปืปในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

เชื้อแบคทีเรีย	ค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ($\mu\text{g/mL}$)				
	ปิโตรเลียมอีเทอร์	เบนซีน	คลอโรฟอร์ม	เมทานอล	น้ำ
<i>P. aeruginosa</i>	10	50	50	50	50
<i>E. coli</i>	200	100	50	50	25
<i>S. aureus</i>	50	100	50	50	50
<i>B. subtilis</i>	25	100	50	50	25

Kiran, Lalitha, and Raveesha (2012) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (Antifungal) จากส่วนสกัดหยาบชั้นน้ำของปืป โดยทดสอบกับเชื้อรา 8 สายพันธุ์ที่พบในข้าวโพดด้วยวิธี Poison Food Technique พบว่าที่ความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบ 50% มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ *A. flavus* มากที่สุด คือ 93.4% รองลงมาคือ *F. oxysporum* (90.2%), *F. solani* (89.5%), *F. moniliforme* (87.7%), *A. candidus* (78.9%), *A. niger* (78.0%), *A. flavipes* (73.2%) และ *F. graminearum* (52.1%) ตามลำดับ และยังมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Bavistin และ Thiram อีกด้วย ดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในข้าวโพด ด้วยส่วนสกัดหยาดชั้นน้ำของใบปีบ

เชื้อรา	Mycelia Growth Inhibition (%)				
	ความเข้มข้นของส่วนสกัดชั้นน้ำของใบปีบ			Bavistin ^a	Thiram ^a
	10%	20%	30%	2%	2%
<i>F. graminearum</i>	10.0 ± 0.1	18.9 ± 0.1	28.3 ± 0.1	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>F. moniliforme</i>	16.2 ± 0.0	29.3 ± 0.1	42.7 ± 0.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>F. oxysporum</i>	18.1 ± 0.1	38.0 ± 0.0	51.3 ± 0.0	100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.1
<i>F. solani</i>	16.2 ± 0.0	28.9 ± 0.0	45.9 ± 0.1	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.2
<i>A. niger</i>	10.0 ± 0.2	23.9 ± 0.0	43.9 ± 0.0	100.0 ± 0.2	100.0 ± 0.1
<i>A. flavus</i>	19.2 ± 0.0	39.2 ± 0.0	68.9 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>A. flavipes</i>	12.4 ± 0.0	21.0 ± 0.0	38.4 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>A. candidus</i>	11.2 ± 0.0	23.9 ± 0.0	43.1 ± 0.0	100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.1

^a = สารมาตรฐาน

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

เชื้อรา	Mycelia Growth Inhibition (%)			
	ความเข้มข้นของส่วนสกัดชั้นน้ำของใบปีบ		Bavistin ^a	Thiram ^a
	40%	50%	2%	2%
<i>F. graminearum</i>	36.1 ± 0.1	52.1 ± 0.1	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>F. moniliforme</i>	65.2 ± 0.1	87.7 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>F. oxysporum</i>	72.9 ± 0.0	90.2 ± 0.1	100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.1
<i>F. solani</i>	68.9 ± 0.0	89.5 ± 0.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.2
<i>A. niger</i>	61.1 ± 0.0	78.0 ± 0.1	100.0 ± 0.2	100.0 ± 0.1
<i>A. flavus</i>	81.3 ± 0.0	93.4 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>A. flavipes</i>	56.8 ± 0.1	73.2 ± 0.1	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>A. candidus</i>	60.1 ± 0.0	78.9 ± 0.1	100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.1

^a = สารมาตรฐาน

Surendra, Suresh, Astalakshmi, and Babu (2013) รายงานการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของส่วนสกัดหยาบชันน้ำจากเปลือกลำต้นปืปในหนูทดลอง ด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema พบว่าส่วนสกัดหยาบชันน้ำจากเปลือกลำต้นปืปมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูทดลองดีเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน indomethacin ดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดหยาบชันน้ำจากเปลือกลำต้นของปืป ด้วยวิธี Carrageenan-induced rat paw edema

Group	Mean paw volume (mL ± SEM)		
	1 st hr	2 nd hr	3 rd hr
Vehicle control	1.139 ± 0.180	1.139 ± 0.180	1.139 ± 0.180
Negative control	2.615 ± 1.640	2.674 ± 2.346	2.666 ± 1.435
Indomethacin (10 mg/kg)	1.451 ± 1.245***	1.313 ± 1.265***	1.287 ± 2.365***
ส่วนสกัดหยาบ (200 mg/kg)	1.689 ± 1.069***	1.545 ± 1.113***	1.499 ± 1.131***
ส่วนสกัดหยาบ (400 mg/kg)	1.573 ± 1.452***	1.533 ± 1.104***	1.416 ± 1.245***

All the values are mean ± SEM and compared to negative control

ns = Non significant *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, n = 6

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

Group	Mean paw volume (mL ± SEM)	
	4 th hr	5 th hr
Vehicle control	1.139 ± 0.180	1.139 ± 0.180
Negative control	2.604 ± 2.316	2.291 ± 1.415
Indomethacin (10 mg/kg)	1.210 ± 1.256***	1.195 ± 1.025***
ส่วนสกัดหยาบ (200 mg/kg)	1.435 ± 1.068***	1.321 ± 1.025***
ส่วนสกัดหยาบ (400 mg/kg)	1.402 ± 1.608***	1.310 ± 1.521***

All the values are mean ± SEM and compared to negative control

ns = Non significant *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001, n = 6

Kumari and Sharma (2014) รายงานการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอลของใบ ลำต้น ราก และดอกของปีบ พบว่าส่วนที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือ ลำต้น รองลงมาคือ ใบ ราก และดอก ตามลำดับ และส่วนที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด คือ ลำต้น รองลงมาคือ ใบ ดอก และรากตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH พบว่า ลำต้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ ดอก ราก และใบ ตามลำดับ ดังตารางที่ 2-4

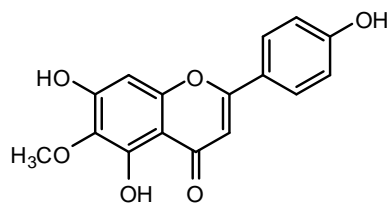
ตารางที่ 2-4 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบ ลำต้น ราก และดอกของปีบ

ส่วนสกัดหยาบ ของปีบ	ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวม (mgGAE/g)	ปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์รวม (mgQE/g)	DPPH assay (IC ₅₀ : µg/mL)
ใบ	54.38 ± 0.027	9.04 ± 0.019	277.82 ± 8.135
ลำต้น	63.56 ± 0.196	10.84 ± 0.003	92.29 ± 7.693
ราก	29.92 ± 0.036	0.364 ± 0.004	230.16 ± 9.083
ดอก	27.30 ± 0.013	2.86 ± 0.005	196.10 ± 2.744

2.6.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปีบ (*M. hortensis*)

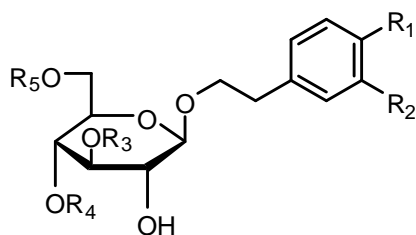
Anulakanapakorn, Bunyapraphasara, and Satayavivad (1986) รายงานการศึกษาศักดิ์และแยกสารองค์ประกอบทางเคมีจากดอกปีบ เพื่อทดสอบฤทธิ์การขยายหลอดเลือด พบฟลาโวนอยด์ที่มีชื่อว่า Hispidulin ซึ่งเป็นสารระเหยได้มีฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดที่ดีกว่า Aminophylline ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

Moongramdi, Bunyapraphasara, Srisukh, and Wagner (1991) ศึกษาสาร Hispidulin ที่แยกได้จากดอกปีบในการตรวจสอบกลไกที่ยับยั้งสารสำคัญที่มีผลก่อให้เกิดอาการหอบหืด คือยับยั้งการเกิดสาร Leukotrienes ใน 5-Lipoxygenase pathway พบว่าที่ความเข้มข้น 64 µM ของสาร Hispidulin สามารถยับยั้งการแตกสลายของ Arachidonic acid ไปเป็น Leukotrienes ได้ถึงร้อยละ 65



ภาพที่ 2-13 สูตรโครงสร้างของ Hispidulin

Hase et al. (1994) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากดอกปีป (*M. hortensis*) พบสารที่มีรายงานมาแล้ว 12 สาร (1-12) นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม Cyclohexylethanoids ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนอีก 9 สาร (13-21) ยืนยันโครงสร้างของสารทั้งหมดที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

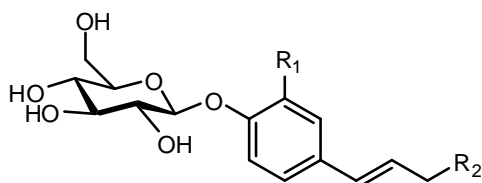


1 : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}, R_5 = \text{H}$

2 : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H},$
 $R_5 = \alpha\text{-L-rhamnopyranosyl}$

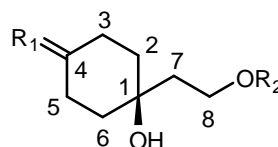
3 : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}, R_5 = \text{H}$

4 : $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \alpha\text{-L-rhamnopyranosyl},$
 $R_4 = \text{caffeoyl}, R_5 = \text{H}$



5 : $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$

6 : $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$

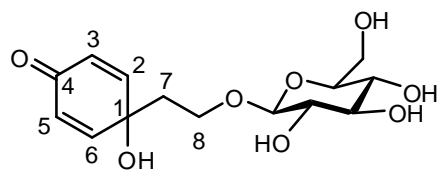


9 : $R_1 = \text{O}, R_2 = \beta\text{-D-glucopyranosyl}$

10 : $R_1 = \begin{matrix} \text{OH} \\ \nearrow \\ \text{H} \end{matrix}, R_2 = \text{H}$

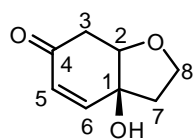
11 : $R_1 = \begin{matrix} \text{OH} \\ \nearrow \\ \text{H} \end{matrix}, R_2 = \beta\text{-D-glucopyranosyl}$

12 : $R_1 = \begin{matrix} \text{H} \\ \nearrow \\ \text{OH} \end{matrix}, R_2 = \text{H}$

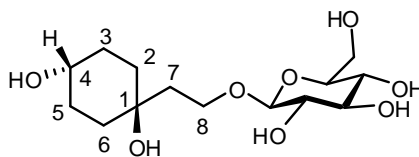


7

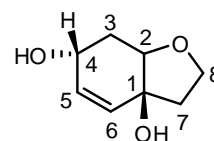
ภาพที่ 2-14 โครงสร้างของสารในกลุ่ม Cyclohexylethanoids ที่แยกได้จากดอกปีป



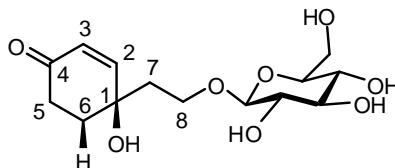
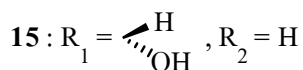
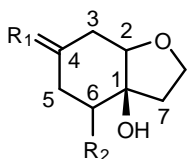
8



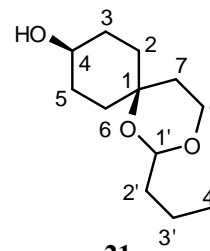
13



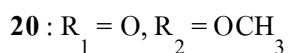
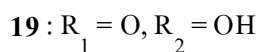
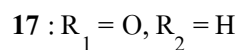
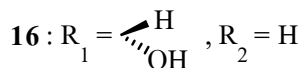
14



18

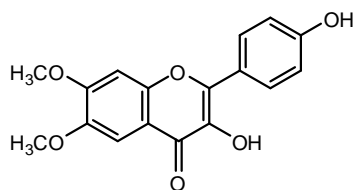


21

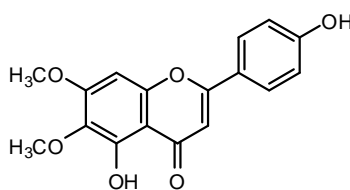


ภาพที่ 2-14 โครงสร้างของสารในกลุ่ม Cyclohexylethanoids ที่แยกได้จากดอกปีบ(ต่อ)

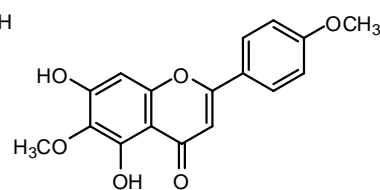
Hase, Ohtani, Kasai, Yamasaki and Pichansoonthon (1995) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบเมทานอลของดอกปีบ (*M. hortensis*) พบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ 7 สาร (22-28) ซึ่งมีการรายงานและยืนยันโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี



Hortensin (22)

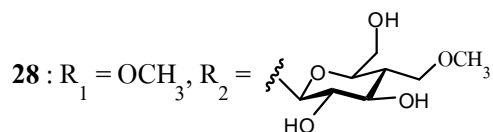
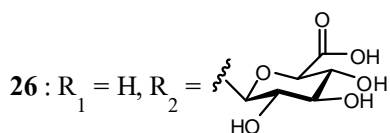
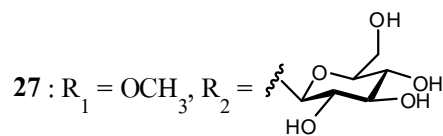
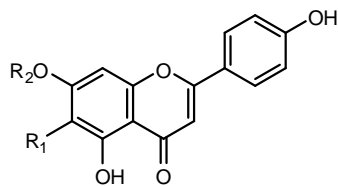


Cirsimaritin (23)



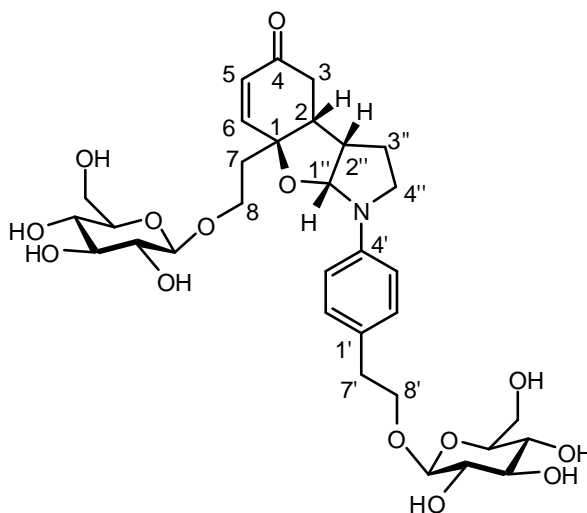
Pectolarigenin (24)

ภาพที่ 2-15 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากดอกปีบ



ภาพที่ 2-15 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากดอกปีป (ต่อ)

Hase, Ohtani, Kasai, Yamasaki, and Picheansoonthon (1995) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดขยายชั้นเมทานอลของก้านดอกปีป (Flower buds) พบ Unusual glucoside alkaloid 1 ชนิด คือ Millingtonine (29) ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี



Millingtonine (29)

ภาพที่ 2-16 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากก้านดอกปีป

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. เครื่องอ่างน้ำ (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. ไม้โครปีเปิดทิป (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. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH)
2. เมทานอล (Methanol, CH_3OH)

3. คลอโรฟอร์ม (Chloroform, CHCl_3)
4. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4)
5. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
6. กรดแกลเซียลแอซิดิก (Glacial acetic acid, CH_3COOH)
7. แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3)
8. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) No.A463-500 G, Univar
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) No.480507, Carlo erba
10. โซเดียมฟอสเฟต (Sodium phosphate tribasic dodecahydrate, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

No. 10101-89-0, Sigma-Aldrich

11. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมอนไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate monohydrate, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) No.10049-21-5, Merck

12. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)

No. 7558-79-4, Merck

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

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

15. แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) No.0716-

01, Baker Analyzed

16. ลวดแมกนีเซียม (Mg ribbon)

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

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

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

20. เคอร์ซีติน (Quercetin) No.33795-1, Aldrich

21. กรดโคจิก (Kojic acid) No.K3125, Sigma-Aldrich

22. น้ำยาทดสอบคราเจนดอร์ฟ (Dragendroff's reagent)

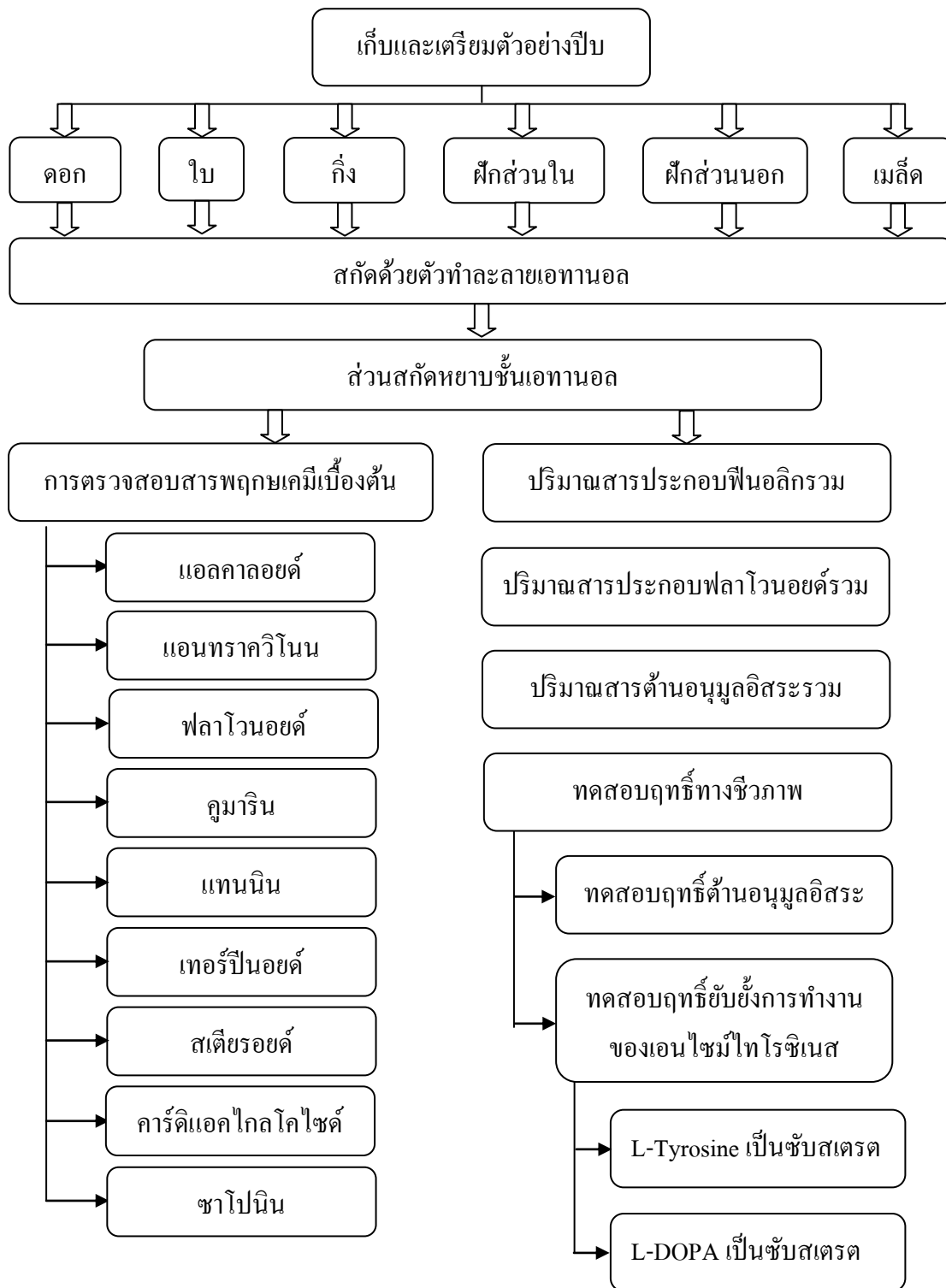
23. น้ำยาทดสอบ ฟอลิน ซีโอแคลตู (Folin-Ciocalteu reagent) No.463562, Carlo erba

24. เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) No.T3824-50KU, Sigma-Aldrich, Tyrosinase from mushroom

25. L-tyrosine No.488152, Carlo Erba

26. L-DOPA No.37830, Fluka

3.2 แผนการดำเนินการวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างปืบ

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ คือ ปืบ (*Millingtonia hortensis*) ประกอบด้วย ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด เก็บจากมหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2557

3.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบของปืบ (*M. hortensis*)

ตัวอย่างปืบ ทั้ง 6 ส่วน ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด โดยดอก ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด เป็นตัวอย่างแห้ง ส่วนใบและกิ่ง เป็นตัวอย่างสด นำแต่ละส่วนมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยทำการแยกบดแต่ละส่วนของปืบ และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างทั้ง 6 ส่วนของปืบมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่างโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล (Ethanol extract) แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างที่ได้ และเก็บตัวอย่างไว้ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.3 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากปืบ โดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และซาโปนิน 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. การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinones)

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

3. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

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

4. การตรวจสอบคูมาริน (Coumarin)

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

5. การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ซึ่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl₃) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

6. การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)

ซึ่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H₂SO₄) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับ กรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

7. การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroids)

ซึ่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดกลacialแอซิดิก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H₂SO₄) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียรอยด์

8. การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ซึ่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl₃) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดกลacialแอซิดิก (Glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H₂SO₄) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

9. การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

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

3.3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic, Skerget, and Knez (2007) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ 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 ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mgGAE/g dried extract)

3.3.5 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium trichloride (AlCl_3) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat, and Legret (1994) โดยใช้เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ AlCl_3 จะทำปฏิกิริยากับ Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (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

เคอร์ซีติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE/g 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 สารต้านอนุมูลอิสระรวมจะทำปฏิกิริยากับ 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 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) เคอร์ซีติน (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 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) จากสูตร % DPPH free radical inhibition = [(A-B)/A] × 100 เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda, and Yonemori (2005) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ เอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยน L-Tyrosine ไปเป็น L-DOPA และ L-DOPA เปลี่ยนไปเป็นสารที่มีสีน้ำตาล เรียกว่า Dopachrome และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย Sodium phosphate buffer (pH 6.8) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 800 U/mL (สำหรับ L-Tyrosine) ความเข้มข้น 400 U/mL (สำหรับ L-DOPA) ใน Sodium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-Tyrosine หรือ L-DOPA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader จากนั้นคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) จากสูตร $\% \text{ Tyrosinase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$ เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

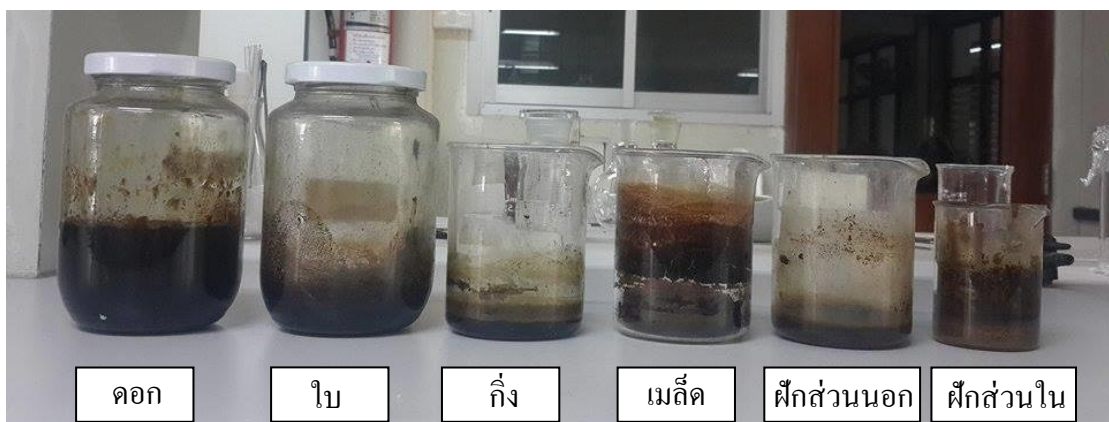
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้ L-Tyrosine และ L-DOPA เป็นซับสเตรต ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ (*Millingtonia hortensis*) ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด ซึ่งมีผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 การสกัดส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของปีบ

จากการสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของปีบทั้ง 6 ส่วน ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด โดยดอก ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด เป็นตัวอย่างแห้ง ส่วนใบและกิ่ง เป็นตัวอย่างสด โดยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำไปกรองแล้วระเหยตัวทำละลายออก จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล (Ethanol extract) พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบมีร้อยละผลผลิต (% Yield) มากที่สุด คือ ร้อยละ 27.36 (ตารางที่ 4-1) สำหรับลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดหยาบดังแสดงในตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักส่วนสกัดหยาบและร้อยละผลผลิต (% Yield) และลักษณะทางกายภาพของ ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ตัวอย่าง ของปีบ	น้ำหนัก (กรัม)		ร้อยละ ผลผลิต	ลักษณะทางกายภาพ ของส่วนสกัด
	พืช	ส่วนสกัดหยาบ		
ดอก ^b	774.54	211.88	27.36	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ใบ ^a	894.68	59.05	6.60	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม
กิ่ง ^a	216.36	14.60	6.75	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ฝักส่วนใน ^b	227.21	30.35	13.36	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
ฝักส่วนนอก ^b	799.36	58.56	7.33	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
เมล็ด ^b	313.24	25.45	8.12	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม

^a = เป็นตัวอย่างสด, ^b = เป็นตัวอย่างแห้ง

4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ (*Millingtonia hortensis*) แบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และซาโปนิน โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008) จากการตรวจสอบดังกล่าว พบสารพฤกษเคมี 5 ชนิด ที่มีปริมาณแตกต่างกันในส่วนต่าง ๆ ของปีบ คือ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน ดังแสดงในตารางที่ 4-2

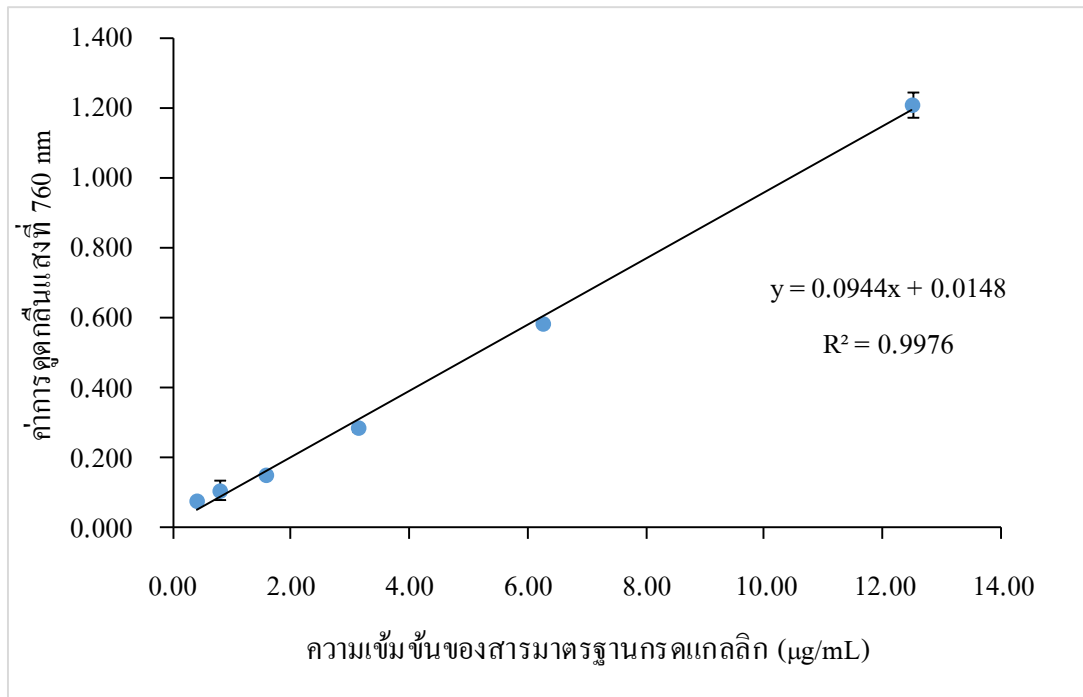
ตารางที่ 4-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

สารพฤกษเคมี	ส่วนสกัดหยาบของปีบ					
	ดอก	ใบ	กิ่ง	ฝักส่วนใน	ฝักส่วนนอก	เมล็ด
แอลคาลอยด์	-	-	-	-	-	-
แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-	-
ฟลาโวนอยด์	++	+++	+	+++	++	++
คูมาริน	++	+++	+	+++	++	+
แทนนิน	+++	++	+	+++	+	+
โพลิบาแทนนิน	-	-	-	-	-	-
เทอร์ปีนอยด์	++	+++	-	+++	++	+
สเตียรอยด์	-	+	-	-	-	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-	-	-	-	-	-
ซาโปนิน	-	-	-	-	-	-

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

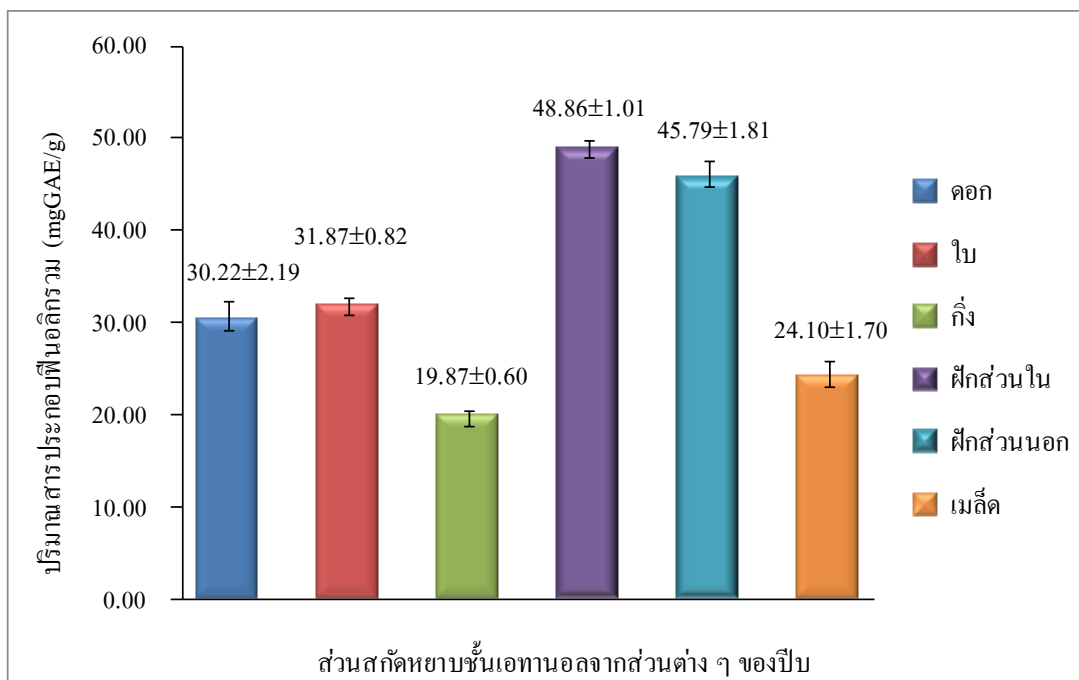
4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic, Skerget, and Knez (2007) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.0944x + 0.0148$, $R^2 = 0.9976$) ดังแสดงในภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

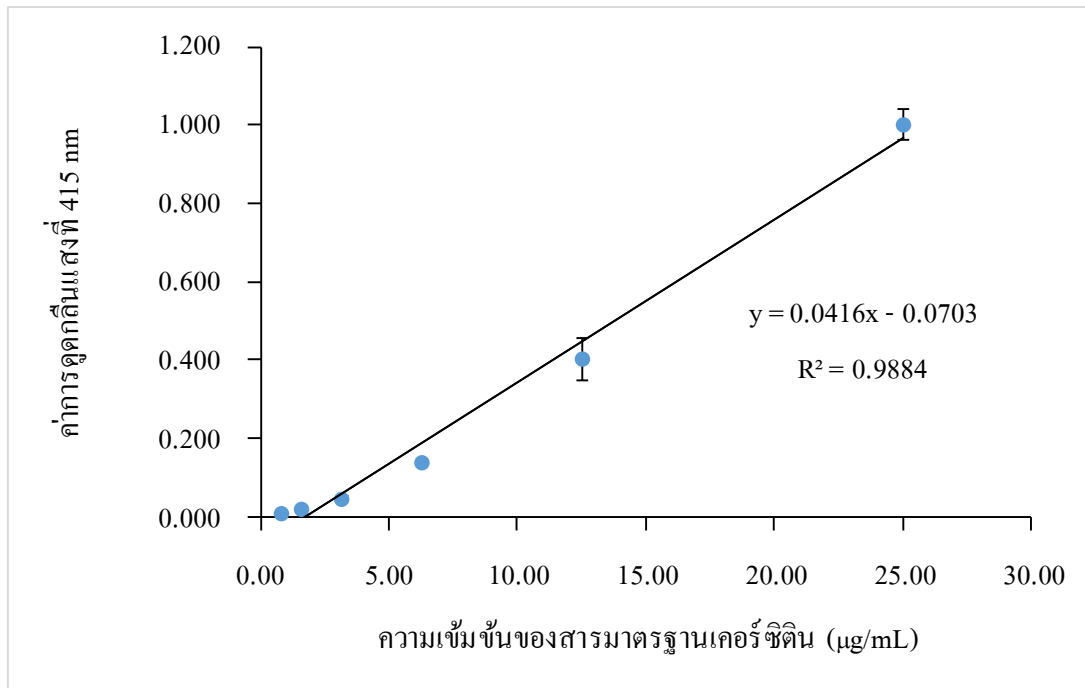
ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mgGAE/g dried extract) พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 48.86 ± 1.01 mgGAE/g รองลงมาได้แก่ ฝักส่วนนอก (45.79 ± 1.81 mgGAE/g) ใบ (31.87 ± 0.82 mgGAE/g) ดอก (30.22 ± 2.1 mgGAE/g) เมล็ด (24.10 ± 1.70 mgGAE/g) และกิ่ง (19.87 ± 0.60 mgGAE/g) ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 ปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ

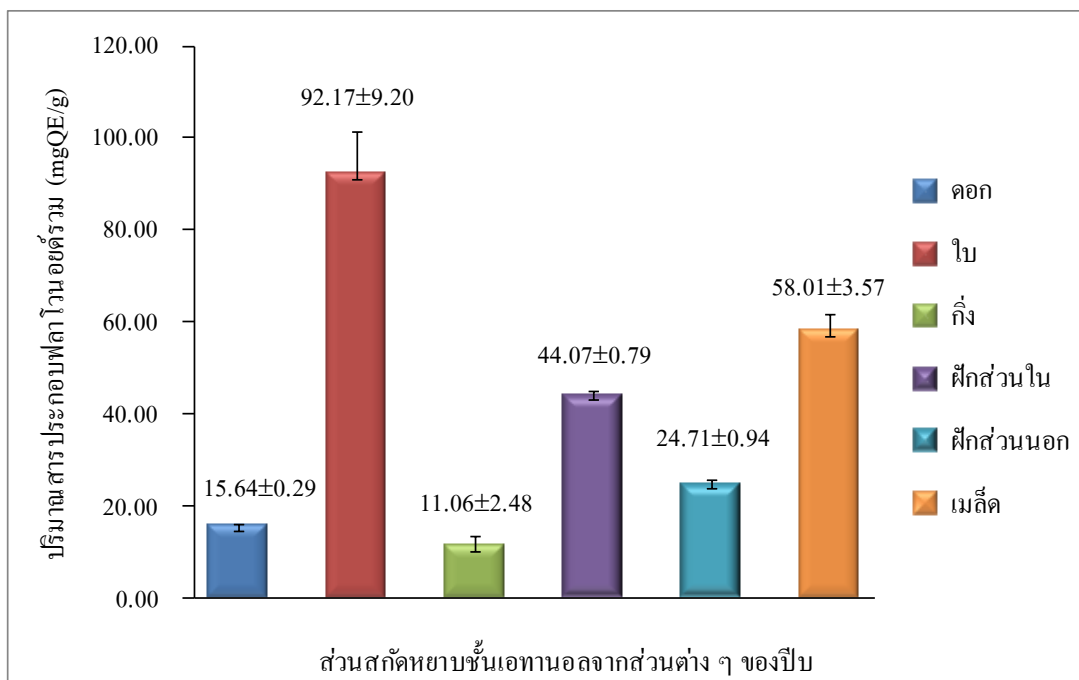
4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat, and Legret (1994) ใช้เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน ($y = 0.0416x - 0.0703$, $R^2 = 0.9884$) ดังแสดงในภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 กราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน

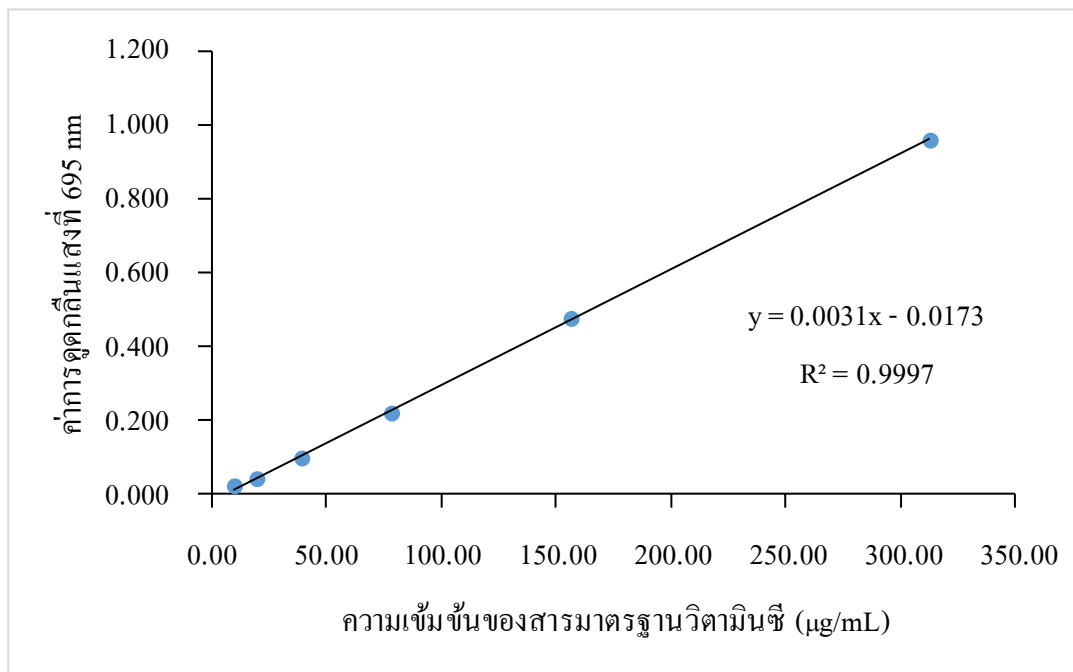
ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานเคอร์ซีตินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE/g dried extract) พบว่า ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด เท่ากับ 92.25 ± 9.15 mgQE/g รองลงมาได้แก่ เมล็ด (58.06 ± 3.57 mgQE/g) ฝักส่วนใน (44.07 ± 1.12 mgQE/g) ฝักส่วนนอก (24.73 ± 1.32 mgQE/g) ดอก (15.66 ± 0.40 mgQE/g) และกิ่ง (11.05 ± 2.48 mgQE/g) ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ

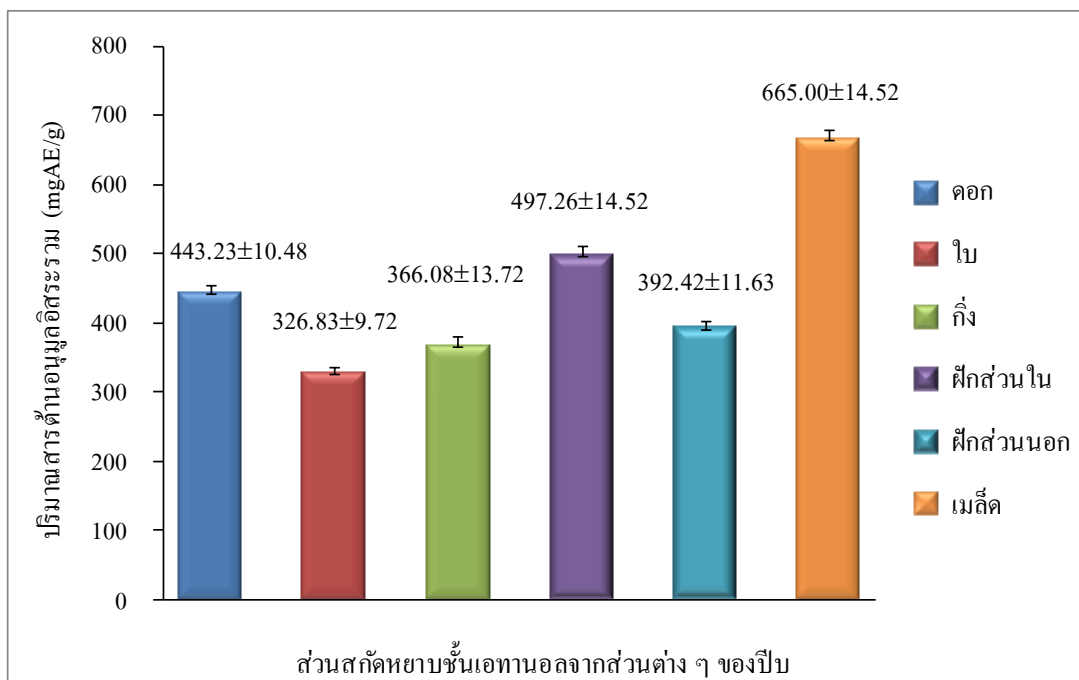
4.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity)

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Prieto, Pineda, and Aguilar (1999) ใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี ($y = 0.0031x - 0.0173$, $R^2 = 0.9997$) ดังแสดงในภาพที่ 4-6



ภาพที่ 4-6 กราฟมาตรฐานวิตามินซี

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่างๆ ของปีบสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานวิตามินซีในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม (Ascorbic acid equivalents, mg AE/g dried extract) พบว่า ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ด มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมสูงสุด เท่ากับ 665.00 ± 14.52 mgAE/g รองลงมาได้แก่ ฟักส่วนใน (497.26 ± 14.52 mgAE/g) ดอก (443.23 ± 10.48 mgAE/g) ฟักส่วนนอก (392.42 ± 11.63 mgAE/g) กิ่ง (366.08 ± 13.72 mgAE/g) และใบ (326.83 ± 9.72 mgAE/g) ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-7



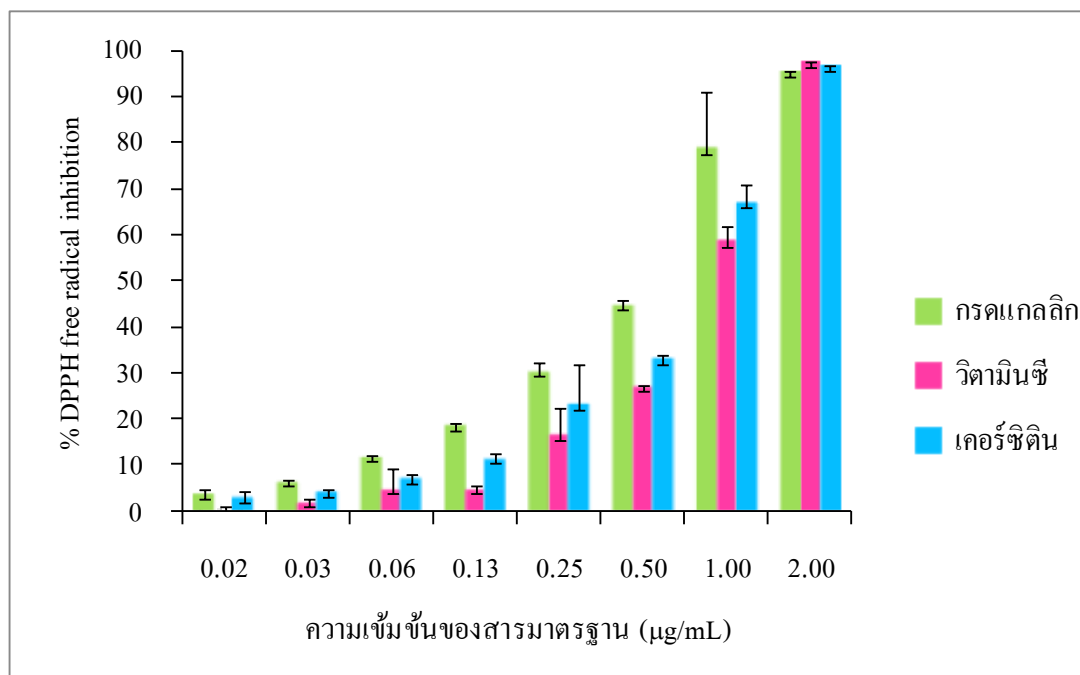
ภาพที่ 4-7 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของส่วนสกัดหายับชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, and Mendez (2002) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) วิตามินซี (L-ascorbic acid) และเคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ กรดแกลลิกมีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เท่ากับ $78.59 \pm 12.39\%$ รองลงมาคือ เคอร์ซีติน ($66.82 \pm 3.88\%$) และวิตามินซี ($58.28 \pm 3.37\%$) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-8

ตารางที่ 4-3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก
วิตามินซี และเคอร์ซีติน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)		
	กรดแกลลิก	วิตามินซี	เคอร์ซีติน
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 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐาน
กรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซีติน

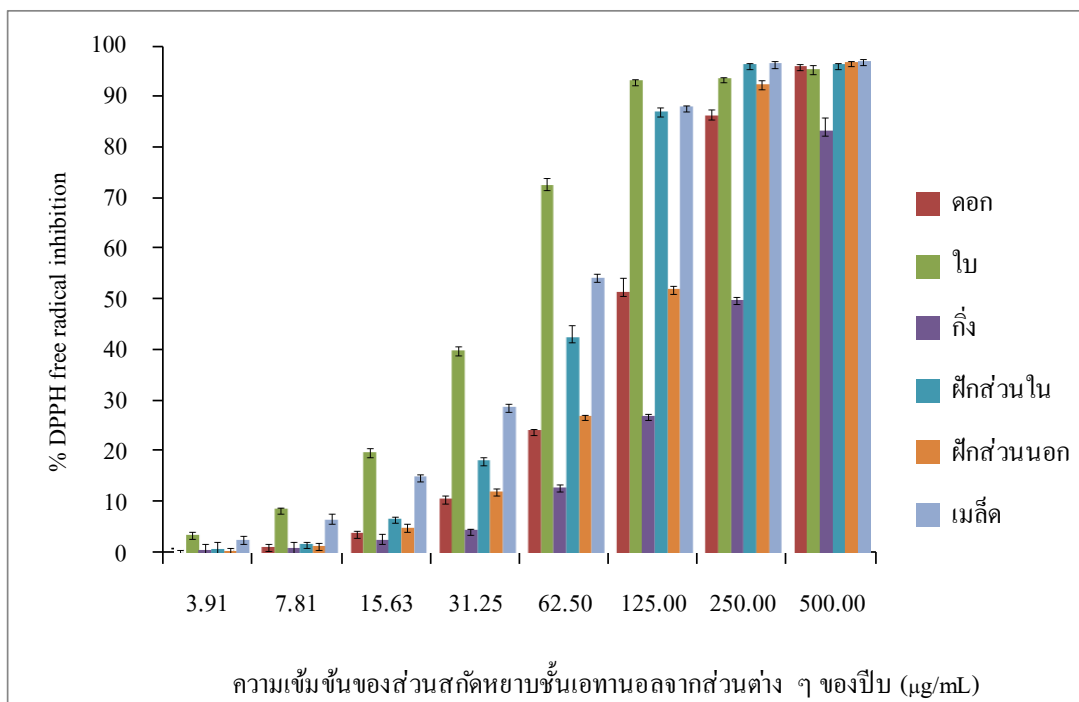
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ทำการทดลองเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน พบว่า ที่ความเข้มข้น 250.00 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของปีบ มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เท่ากับ $95.50 \pm 0.21\%$ รองลงมาคือ ฝักส่วนใน ($95.24 \pm 0.07\%$) ใบ ($92.64 \pm 0.00\%$) ฝักส่วนนอก ($91.28 \pm 0.73\%$) ดอก ($85.34 \pm 1.06\%$) และกิ่ง ($49.48 \pm 0.49\%$) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-9

ตารางที่ 4-4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ความเข้มข้น ของส่วนสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)		
	ดอก	ใบ	กิ่ง
3.91	0.21 ± 0.57	3.82 ± 0.45	0.78 ± 1.04
7.81	1.50 ± 0.43	8.87 ± 0.00	1.24 ± 0.97
15.63	4.08 ± 0.37	19.77 ± 0.66	2.88 ± 1.08
31.25	10.73 ± 0.57	39.54 ± 0.87	4.71 ± 0.20
62.50	24.11 ± 0.12	71.72 ± 1.37	13.07 ± 0.41
125.00	51.07 ± 2.61	92.14 ± 0.12	26.93 ± 0.30
250.00	85.34 ± 1.06	92.64 ± 0.00	49.48 ± 0.49
500.00	94.99 ± 0.12	94.23 ± 0.70	82.35 ± 2.39

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

ความเข้มข้น ของส่วนสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)		
	ฝักส่วนใน	ฝักส่วนนอก	เมล็ด
3.91	1.03 ± 1.26	0.69 ± 0.49	2.86 ± 0.54
7.81	2.05 ± 0.26	1.70 ± 0.42	6.78 ± 1.08
15.63	6.97 ± 0.19	5.23 ± 0.63	15.13 ± 0.25
31.25	18.29 ± 0.51	12.29 ± 0.36	28.62 ± 0.54
62.50	42.11 ± 2.26	26.93 ± 0.14	53.82 ± 0.69
125.00	86.06 ± 0.70	51.54 ± 0.55	87.01 ± 0.12
250.00	95.24 ± 0.07	91.28 ± 0.73	95.50 ± 0.21
500.00	95.20 ± 0.12	95.74 ± 0.12	95.93 ± 0.21



ภาพที่ 4-9 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ของส่วนสกัดหยาบ
ชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ

4.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีที่
ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda, and Yonemori (2005) ใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็น
สารมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-10

ตารางที่ 4-5 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก และส่วนสกัดหยาดชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ โดยใช้ L-Tyrosine เป็น มาตรฐาน

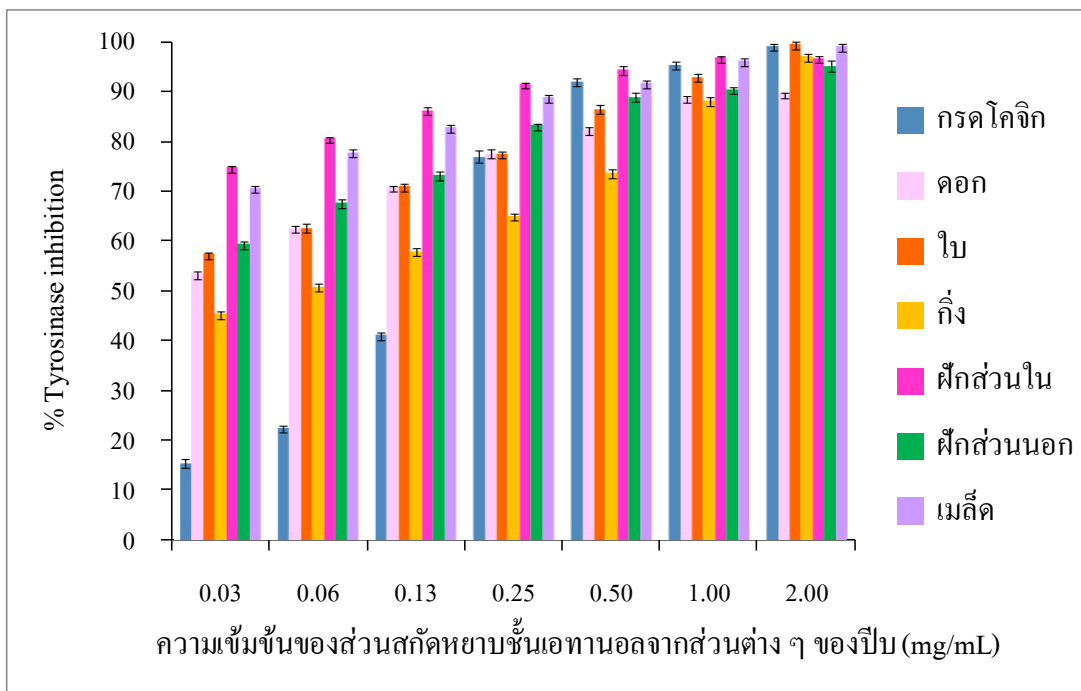
ความเข้มข้น ของส่วนสกัด (mg/mL)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)			
	กรดโคจิก ^a	ดอก	ใบ	กิ่ง
0.03	18.03 ± 0.82	54.69 ± 0.39	58.60 ± 0.23	47.01 ± 0.45
0.06	24.86 ± 0.47	63.67 ± 0.39	63.71 ± 0.81	52.21 ± 0.60
0.13	42.90 ± 0.47	71.61 ± 0.23	71.77 ± 0.40	59.11 ± 0.60
0.25	77.32 ± 1.25	78.13 ± 0.68	78.09 ± 0.23	66.02 ± 0.39
0.50	92.08 ± 0.47	82.68 ± 0.45	86.69 ± 0.70	74.35 ± 0.60
1.00	95.36 ± 0.47	88.80 ± 0.45	92.88 ± 0.62	88.28 ± 0.78
2.00	98.91 ± 0.47	89.71 ± 0.23	99.33 ± 0.47	96.88 ± 0.39

^a = สารมาตรฐาน

ตารางที่ 4-5 (ต่อ)

ความเข้มข้น ของส่วนสกัด (mg/mL)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)			
	กรดโคจิก ^a	ฝักส่วนใน	ฝักส่วนนอก	เมล็ด
0.03	18.03 ± 0.82	75.42 ± 0.23	60.53 ± 0.48	71.39 ± 0.26
0.06	24.86 ± 0.47	81.05 ± 0.23	68.48 ± 0.64	78.32 ± 0.44
0.13	42.90 ± 0.47	86.54 ± 0.60	73.92 ± 0.64	83.19 ± 0.44
0.25	77.32 ± 1.25	91.63 ± 0.23	83.54 ± 0.24	88.94 ± 0.44
0.50	92.08 ± 0.47	94.38 ± 0.60	89.12 ± 0.72	91.74 ± 0.51
1.00	95.36 ± 0.47	96.73 ± 0.23	90.52 ± 0.48	96.02 ± 0.44
2.00	98.91 ± 0.47	96.60 ± 0.23	94.98 ± 1.11	98.82 ± 0.51

^a = สารมาตรฐาน



ภาพที่ 4-10 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก และ ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ โดยใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน กรดโคจิก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ โดยใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรต พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของฝักส่วนในของปีบสามารถ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด เท่ากับ $96.73 \pm 0.23\%$ รองลงมาคือ ฝักส่วนใน ($96.73 \pm 0.23\%$) เมล็ด ($96.02 \pm 0.44\%$) ใบ ($92.88 \pm 0.62\%$) ฝักส่วนนอก ($90.52 \pm 0.48\%$) ดอก ($88.80 \pm 0.45\%$) และกิ่ง ($88.28 \pm 0.78\%$) ตามลำดับ และพบว่าค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนสส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของฝักส่วนในและเมล็ดมีค่ามากกว่าสารมาตรฐาน กรดโคจิก ($95.36 \pm 0.47\%$) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด คือ 0.03 mg/mL ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของทุกส่วนของปีบยังคงมีฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก อีกด้วย

4.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda, and Yonemori (2005) ใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังในตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-11

ตารางที่ 4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต

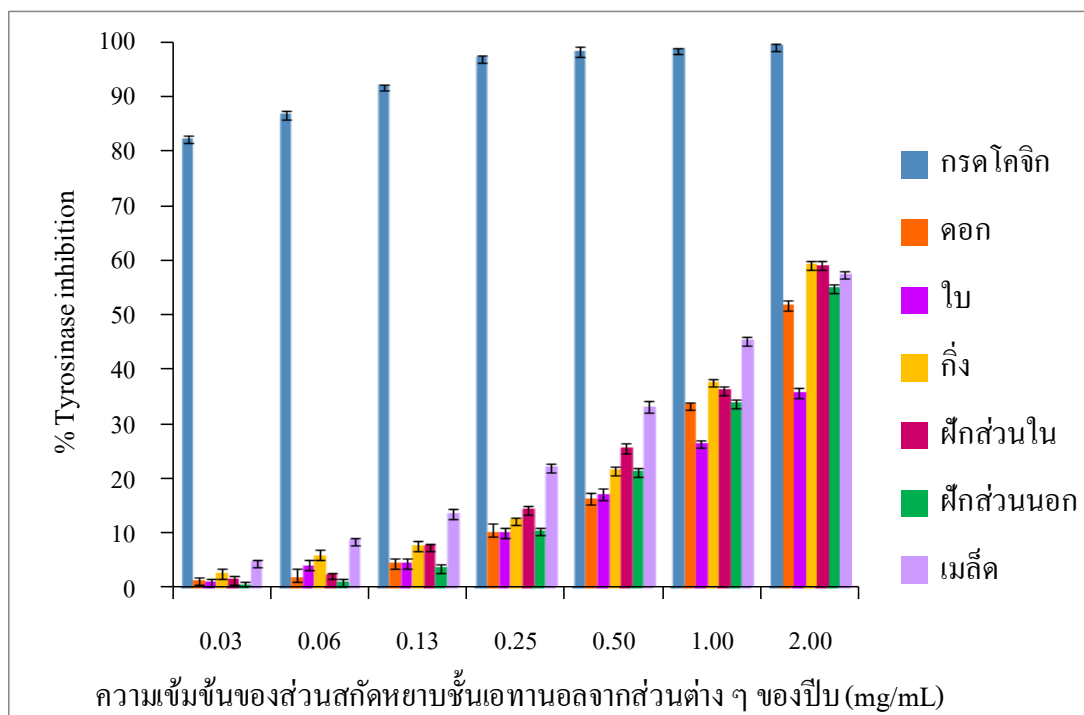
ความเข้มข้น ของส่วนสกัด (mg/mL)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)			
	กรดโคจิก ^a	ดอก	ใบ	กิ่ง
0.03	82.67 ± 0.44	1.44 ± 0.31	1.10 ± 0.54	2.67 ± 0.72
0.06	87.11 ± 0.44	1.98 ± 1.36	4.07 ± 0.98	5.97 ± 0.98
0.13	92.44 ± 0.00	4.50 ± 0.83	4.54 ± 0.72	7.70 ± 0.72
0.25	97.48 ± 0.26	10.27 ± 1.62	10.17 ± 0.72	12.58 ± 0.27
0.50	98.67 ± 0.77	16.22 ± 1.08	17.06 ± 1.08	21.70 ± 0.47
1.00	99.11 ± 0.00	33.69 ± 0.31	26.60 ± 0.54	37.89 ± 0.54
2.00	99.70 ± 0.26	51.89 ± 0.94	35.84 ± 0.98	59.43 ± 0.47

^a = สารมาตรฐาน

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

ความเข้มข้น ของส่วนสกัด (mg/mL)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)			
	กรดโคจิก ^a	ฝักส่วนใน	ฝักส่วนนอก	เมล็ด
0.03	82.67 ± 0.44	1.53 ± 0.53	0.50 ± 0.50	4.76 ± 0.26
0.06	87.11 ± 0.44	2.45 ± 0.26	1.17 ± 0.29	8.78 ± 0.26
0.13	92.44 ± 0.00	7.65 ± 0.26	3.67 ± 0.58	13.69 ± 0.68
0.25	97.48 ± 0.26	14.37 ± 0.70	10.50 ± 0.50	22.17 ± 0.68
0.50	98.67 ± 0.77	25.69 ± 0.79	21.33 ± 0.58	33.18 ± 1.12
1.00	99.11 ± 0.00	36.39 ± 0.70	34.00 ± 0.50	45.54 ± 0.45
2.00	99.70 ± 0.26	59.33 ± 0.70	55.17 ± 0.58	57.74 ± 0.52

^a = สารมาตรฐาน



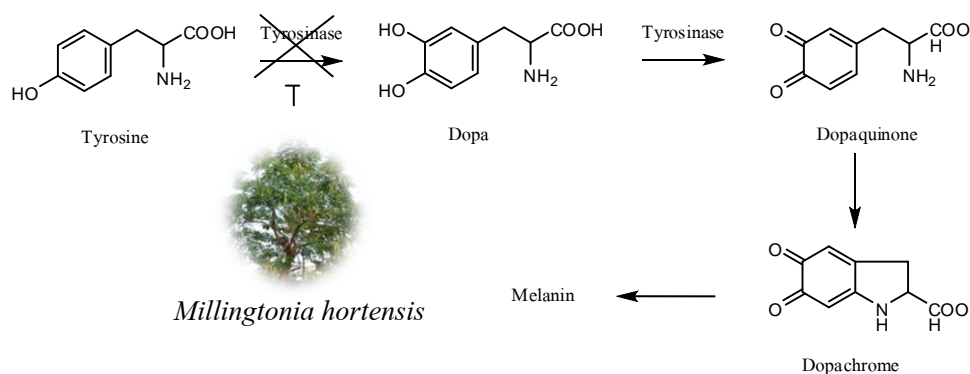
ภาพที่ 4-11 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก และ ส่วนสกัดหยาบขึ้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีป โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก และส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบโดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของเมล็ดของปีบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด เท่ากับ 57.74 ± 0.52 % รองลงมาคือ กิ่ง (37.89 ± 0.54 %) ฝักส่วนใน (36.39 ± 0.70 %) ฝักส่วนนอก (34.00 ± 0.50 %) ดอก (33.69 ± 0.31 %) ใบ (26.60 ± 0.54 %) ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบยังคงน้อยกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก (95.36 ± 0.47 %)

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ L-Tyrosine และ L-DOPA เป็นซับสเตรต พบว่าทุกส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของปีบที่ใช้ L-Tyrosine เป็นซับสเตรต มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต ในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทำการทดลอง

จากการศึกษาส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของฝักส่วนใน และเมล็ดของปีบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด เมื่อใช้ซับสเตรตเป็น L-Tyrosine (96.73 ± 0.23 % และ 96.02 ± 0.44 %) และ L-DOPA (36.39 ± 0.70 % และ 45.54 ± 0.45 %)

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากทุกส่วนของปีบมีความจำเพาะเจาะจงต่อฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในขั้นตอนที่ 1 ดีกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ซึ่งเป็นการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ของ Tyrosine ไปเป็น DOPA ดังภาพที่ 4-12



ภาพที่ 4-12 การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ของ Tyrosine ไปเป็น DOPA ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากปีบ

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม และฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนใน เมล็ด และใบของปืบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดในลำดับที่กล่าวมา ผลดังกล่าวน่าจะเป็นผลมาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมที่พบในปริมาณมากที่สุดจากส่วนสกัดดังกล่าว นอกจากนี้ยังให้ผลสอดคล้องกับสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบสารในกลุ่มฟีนอลิกคือ ฟลาโวนอยด์และแทนนินอีกด้วย

ดังนั้นจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบมีศักยภาพที่จะสามารถนำไปพัฒนาและใช้ประโยชน์ทางยาหรือเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไปได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ (*Millingtonia hortensis*) ได้แก่ ดอก ใบ กิ่ง ฝักส่วนใน ฝักส่วนนอก และเมล็ด ตรวจสอบพบสารพฤกษเคมี 5 ชนิด คือ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน

จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์ และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมค่อนข้างสูง สอดคล้องกับการศึกษาของค้ประกอบทางเคมีของ Kumari และ Sharma (Kumari & Sharma, 2014) และ Hase, Ohtani, Kasai, Yamasaki และ Picheansoonthon (Hase, Ohtani, Kasai, Yamasaki, & Picheansoonthon, 1995) ที่พบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

เมื่อนำส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่าที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของปีบมีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนัง โดยมียับยั้งที่ 2 ชนิด คือ L-Tyrosine และ L-DOPA จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 mg/mL ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในและเมล็ดของปีบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด เมื่อใช้ยับยั้งเป็น L-Tyrosine ($96.73 \pm 0.23\%$ และ $96.02 \pm 0.44\%$) และ L-DOPA ($36.39 \pm 0.70\%$ และ $45.54 \pm 0.45\%$) จากผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ L-Tyrosine เป็นยับยั้ง พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของฝักส่วนในและเมล็ดของปีบยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ($95.36 \pm 0.47\%$) อีกด้วย จากผลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากปีบมีศักยภาพสูงที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาหรือเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยต่อไปควรศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น เอนไซม์ลิพอกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์จากตับ เซลล์จากไต เซลล์มะเร็ง รวมทั้งผิวหนัง เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาสมุนไพรในการรักษาโรคและเป็นเครื่องสำอางต่อไป

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาพรรณ สาลี, เขวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2(ฉบับพิเศษ), 143-150.
- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2553). *ฐานข้อมูลสมุนไพร: ปืบ*. เข้าถึงได้จาก <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=237>.
- จินดาพร คงเดช. (2551). *การผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชเพื่อใช้ในเครื่องสำอาง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- นริสา คำแก่น. (2551). *การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: ก้อปปี๊บุ๊กส์.
- พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์. (2557). *ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดดอกไม้ไทย: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส 2 และ 9 และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พอใจ รัตนปนัดดา. (2553). *การประยุกต์ใช้ไคโตซานในการเตรียมอาร์บูตินไมโครพาร์ติเคิลเพื่อทำให้ผิวขาว*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รุ่งฤดี ศรีสวัสดิ์. (2555). *ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคซิเดส*. รายงานการวิจัย, สาขาวิชาสรีรวิทยา, สำนักวิชาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วรินดา นันตา และสุกัญญา มั่นอิม. (2546). *การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในพืชไทยบางชนิด*. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาบริหารเภสัชกรรม, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร.

- Anulakanapakorn, K., Bunyapraphasara, N., & Satayavivad, J. (1986). Phytochemical and pharmacological studies of the flowers of *Millingtonia hortensis*. *Journal of The Science Society of Thailand*, 13, 71-83.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal 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.
- Braca, A., Sortio, C., Politi, M., Morelli, I., & Mendez, J. (2000). Antioxidant activity of flavomoids from *Licania licaniaflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 379-381.
- Hase, T., Kawamoto, Y., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki K., & Picheansoonthon, C. (1994). Cyclohexylethanoids and related glucosides from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry*, 39(1), 235-241.
- Hase, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki K., & Picheansoonthon, C. (1995). Revised structure for hortensin, a flavonoid from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry*, 40(1), 287-290.
- Hase, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki K., & Picheansoonthon, C. (1995). Millingtonine, an unusual glucosidal alkaloid from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry*, 41(1), 317-321.
- Kiran, B., Lalitha, V., & Raveesha, K.A. (2012). Investigation of antifungal potentiality of aqueous extract of *Millingtonia hortensis* leaves against *Aspergillus* and *Fusarium* species of maize. *International Journal Institutional Pharmacy and Life Science*, 2(3).
- Kumari, A., & Sharma, A.R. (2014). Estimation of total phenolic, flavonoidal content and evaluation of antioxidant activity of methanolic extract of *Millingtonia hortensis*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 3, 1646-1655.
- Nagaraja, M. S., & Padmaa, M. P. (2011). Antibacterial activity of *Millingtonia hortensis* Linn. stem bark. *Asian journal of pharmaceutical and biological research*, 1(3), 384-386.

- Majhenic, L., Skerget, M., & Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of quarana seed extracts. *Food Chemistry*, *104*(3), 1258-1268.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extract of seashore plant and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*, *69*, 197-201.
- Moongrarni, P., Bunyapraphasara, N., Srisukh, V., & Wagner, H. (1991). The inhibitory activity in 5-lipoxygenase pathway of hispidulin from *Millingtonia hortensis*. *Journal of The Science Society of Thailand*, *17*, 51-56.
- 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.
- Surendra, K.M., Suresh, K.S., Astalakshmi, N., & Babu, G. (2013). Anti-inflammatory effect of aqueous extract of *Millingtonia hortensis* Linn. stem bark on rats. *International research journal of Pharmacy*, *4*(4), 104-105.
- Tansuwanwong, S., Yamamotoz, H., Imaiz, K., & Viniketumnuen, U. (2007). Antiproliferative effect on colon cancer cell line by aqueous extract from the bark of *Millingtonia hortensis*. *Chiang Mai Medical Journal*, *46*(2), 61-66.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การคำนวณร้อยละผลผลิต
(% Yield)

1. การคำนวณร้อยละผลผลิต (% Yield)

จากสูตรการคำนวณ

$$\% \text{ Yield} = (\text{น้ำหนักส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล/น้ำหนักตัวอย่าง}) \times 100$$

$$\text{น้ำหนักของดอกปีบ} = 774.54 \text{ กรัม}$$

$$\text{น้ำหนักส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของดอกปีบ} = 211.88 \text{ กรัม}$$

$$\text{แทนค่า } \% \text{ Yield} = (\text{น้ำหนักส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล/น้ำหนักตัวอย่าง}) \times 100$$

$$\% \text{ Yield} = (211.88/774.54) \times 100$$

$$\% \text{ Yield} = 27.36$$

ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของดอกปีบ มี % Yield เท่ากับ 27.36

ตารางภาคผนวก ก-1 น้ำหนักของส่วนต่าง ๆ ของปีบ น้ำหนักส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล และร้อยละผลผลิต

ส่วนต่าง ๆ ของปีบ	น้ำหนักของส่วนต่าง ๆ ของปีบ (กรัม)	น้ำหนักส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (% Yield)
ดอก	774.54	211.88	27.36
ใบ	894.68	59.05	6.60
กิ่ง	216.36	14.6	6.75
ฝักส่วนใน	227.21	30.35	13.36
ฝักส่วนนอก	799.36	58.56	7.33
เมล็ด	313.24	25.45	8.12

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

(Total Phenolic Content)

2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

2.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

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

2.1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5% (w/v)

2.1.3 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 0.1 mg/mL ในเมทานอล โดยชั่งกรดแกลลิก 0.1 mg ละลายในเมทานอล 1.0 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 100-0.19 $\mu\text{g/mL}$ เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

2.1.4 สารละลายตัวอย่างในตัวทำละลายเมทานอล เข้มข้น 2.0 mg/mL

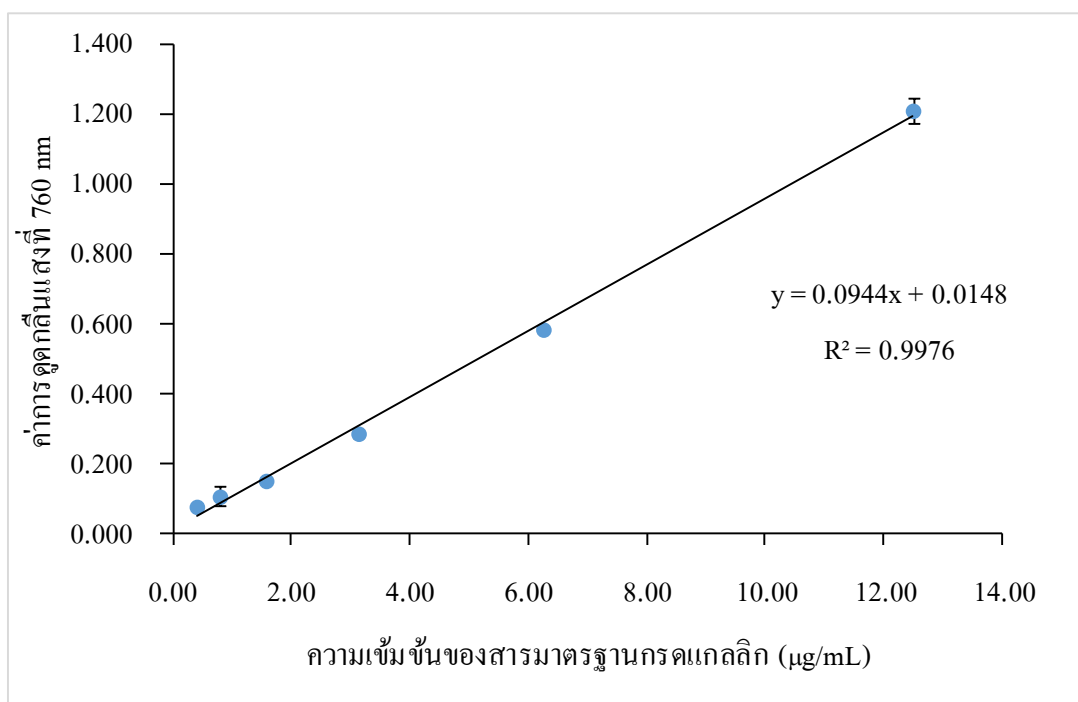
2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

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 และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mgGAE/g dried extract)

2.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำการหาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของ กรดแกลลิก ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 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 $y = 0.0944x + 0.0148$, $R^2 = 0.9976$

ภาพภาคผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

2.4 จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ตารางภาคผนวก ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ส่วนสกัดหยาบ ชั้นเอทานอลจากปีบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ดอก	0.20	0.563	0.633	0.560
ใบ	0.10	0.307	0.322	0.318
กิ่ง	0.20	0.377	0.395	0.398
ฝักส่วนใน	0.10	0.465	0.481	0.482
ฝักส่วนนอก	0.20	0.840	0.897	0.901
เมล็ด	0.10	0.226	0.243	0.258

2.5 กำหนดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบในหน่วย mgGAE/g

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก คือ $y = 0.0944x + 0.0148$

ค่าการดูดกลืนแสงของของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบที่ความเข้มข้น 0.20 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.563 จะได้ว่า

$$\text{จากสมการ} \quad y = 0.0944x + 0.0148$$

$$\text{แทนค่า} \quad y = 0.563$$

$$0.563 = 0.0944x + 0.0148$$

$$x = 5.807$$

ในส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบที่ความเข้มข้น 0.2 mg/mL มีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 5.807 μgGAE

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วย mgGAE/g

$$\begin{aligned} \text{ส่วนสกัดตัวอย่าง } 0.20 \text{ mg} & \quad \text{มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก} & 5.807 \text{ } \mu\text{gGAE} \\ \text{ถ้าส่วนสกัดตัวอย่าง } 1,000 \text{ mg} & \quad \text{มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก} & \frac{5.807 \text{ } \mu\text{gGAE} \times 1,000 \text{ mg}}{0.20 \text{ mg}} \\ & & = 29.04 \text{ mgGAE/g} \end{aligned}$$

ดังนั้น ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 29.04 mgGAE/g

นำค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ

2.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบในหน่วย mgGAE/g

ตารางภาคผนวก ข-3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ส่วนสกัดหยาบ ชั้นเอทานอลจากปีบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม mgGAE/g				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
ดอก	0.20	29.04	32.74	28.88	30.22	2.19
ใบ	0.10	30.95	32.54	32.12	31.87	0.82
กิ่ง	0.20	19.18	20.14	20.30	19.87	0.60
ฝักส่วนใน	0.10	47.69	49.39	49.49	48.86	1.01
ฝักส่วนนอก	0.20	43.71	46.73	46.94	45.79	1.81
เมล็ด	0.10	22.37	24.17	25.76	24.10	1.70

ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

(Total Flavonoids Content)

3. ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ด้วยวิธี

Aluminium trichloride (AlCl₃) colorimetric

3.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

3.1.1 สารละลาย Aluminum trichloride (AlCl₃) ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) ในตัวทำละลายเมทานอล

3.1.2 สารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (Quercetin) ในตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น 0.1-0.0001 mg/mL โดยชั่งเคอร์ซีติน 0.1 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 100-0.19 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

3.1.3 สารละลายตัวอย่างในตัวทำละลายเมทานอล เข้มข้น 2.0 mg/mL

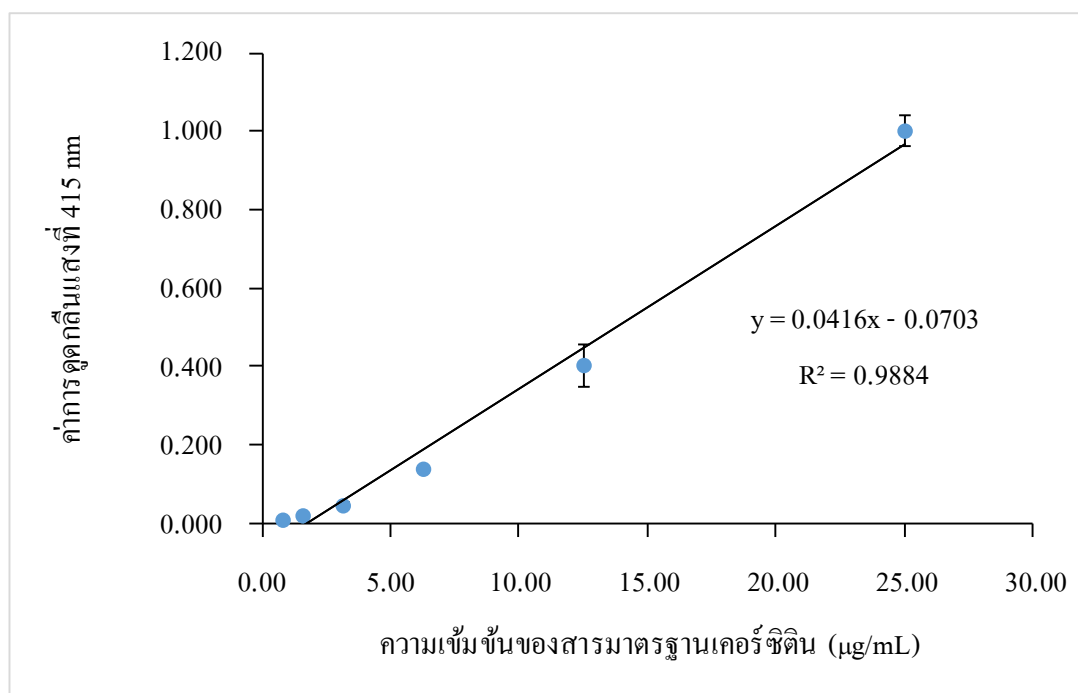
3.2 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

ผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการจะทดสอบ ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (AlCl₃ reagent) ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ปริมาตร 1.8 mL ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE/g dried extract)

3.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน ทำการหาสมการเส้นตรง และค่า R² จากกราฟมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน

ความเข้มข้น ของเคอร์ซีติน ($\mu\text{g/mL}$)	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



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

ภาพภาคผนวก ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน

3.4 จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ตารางภาคผนวก ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ส่วนสกัดหยาบ ชั้นเอทานอลจากปีบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ดอก	0.50	0.255	0.249	0.261
ใบ	0.13	0.356	0.449	0.422
กิ่ง	0.50	0.103	0.172	0.204
ฝักส่วนใน	0.50	0.830	0.846	0.863
ฝักส่วนนอก	0.50	0.444	0.424	0.463
เมล็ด	0.25	0.494	0.537	0.568

3.5 กำหนดหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบในหน่วย mgQE/g

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซีติน คือ $y = 0.0416x - 0.0703$

ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.255 จะได้ว่า

$$\text{จากสมการ} \quad y = 0.0416x - 0.0703$$

$$\text{แทนค่า} \quad y = 0.255$$

$$0.255 = 0.0416x - 0.0703$$

$$x = 7.820$$

ในส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 7.820 μgQE

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วย mgQE/g

$$\begin{aligned} \text{ส่วนสกัดตัวอย่าง } 0.50 \text{ mg} & \quad \text{มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน} & 7.820 \text{ } \mu\text{gQE} \\ \text{ถ้าส่วนสกัดตัวอย่าง } 1,000 \text{ mg} & \quad \text{มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีติน} & \frac{7.820 \text{ } \mu\text{gQE} \times 1,000 \text{ mg}}{0.50 \text{ mg}} \\ & & = 15.64 \text{ mg QE/g} \end{aligned}$$

ดังนั้นส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 15.64 mgQE/g

นำค่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ

3.6 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบในหน่วย mgQE/g

ตารางภาคผนวก ค-3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ส่วนสกัดหยาบ ชั้นเอทานอล จากปีบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณฟีนอลิกรวม mgQE/g				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
ดอก	0.50	15.64	15.35	15.93	15.64	0.29
ใบ	0.13	81.98	99.87	94.67	92.17	9.20
กิ่ง	0.50	8.33	11.65	13.19	11.06	2.48
ฝักส่วนใน	0.50	43.28	44.05	44.87	44.07	0.79
ฝักส่วนนอก	0.50	24.73	23.76	25.64	24.71	0.94
เมล็ด	0.25	54.26	58.39	61.38	58.01	3.57

ภาคผนวก ง

การเตรียมสาร และการคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม

(Total Antioxidant Capacity)

4. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant Capacity) ด้วยวิธี

Phosphomolybdate colorimetric

4.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

4.1.1 สารละลาย Phosphomolybdate reagent โดยผสมสารดังต่อไปนี้

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

4.1.2 สารละลายมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) ในตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น 5 mg/mL โดยชั่งวิตามินซี 5.0 mg ละลายในเมทานอล 1 mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.5-0.001 mg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

4.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 2.0 mg/mL ในเมทานอล

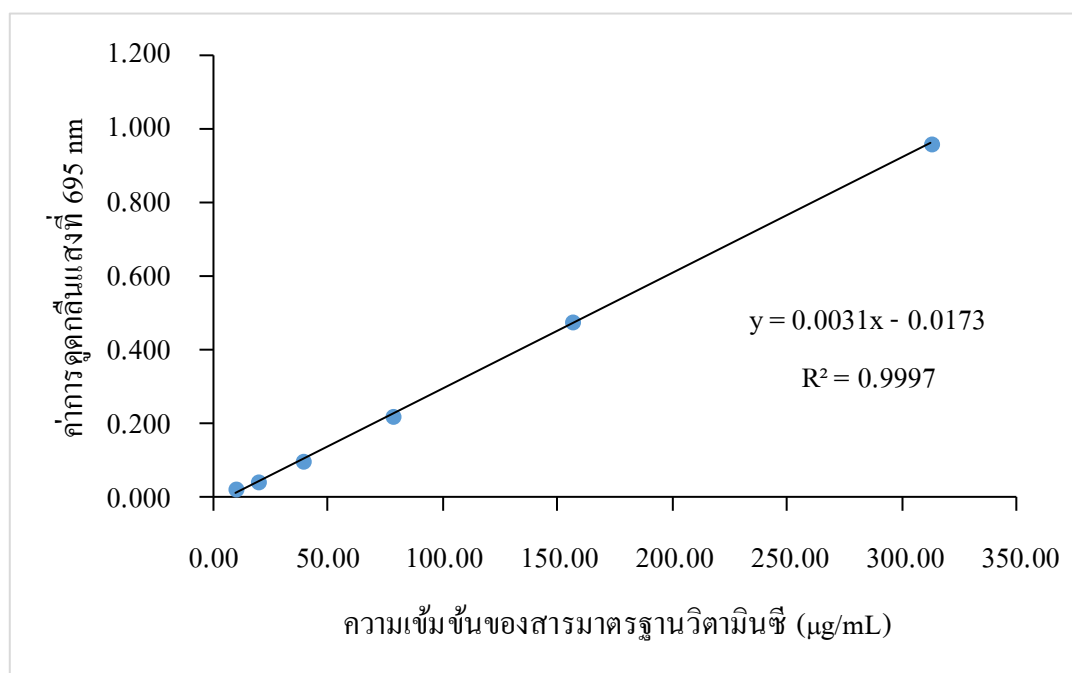
4.2 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total antioxidant capacity)

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 ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม (Ascorbic acid equivalents, mgAE/g dried extract)

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

ตารางภาคผนวก ง-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของสารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid)

ความเข้มข้น ของวิตามินซี ($\mu\text{g/mL}$)	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 $y = 0.0031x - 0.0173$, $R^2 = 0.9997$

ภาพภาคผนวก ง-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานวิตามินซี

4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ตารางภาคผนวก ง-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ส่วนสกัดหยาบ ชั้นเอทานอลจากปีบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 695 nm		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ดอก	0.20	0.251	0.284	0.264
ใบ	0.20	0.179	0.186	0.191
กิ่ง	0.20	0.216	0.213	0.200
ฝักส่วนใน	0.20	0.259	0.300	0.282
ฝักส่วนนอก	0.20	0.224	0.234	0.220
เมล็ด	0.20	0.367	0.386	0.404

4.5 กำหนดหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ในหน่วย mgAE/g

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม

สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินซี คือ $y = 0.0031x - 0.0173$

ค่าการดูดกลืนแสงของของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ ที่ความเข้มข้น 0.20 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.251 จะได้ว่า

$$\text{จากสมการ} \quad y = 0.0031x - 0.0173$$

$$\text{แทนค่า} \quad y = 0.251$$

$$0.251 = 0.0031x - 0.0173$$

$$x = 86.548$$

ในส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ ที่ความเข้มข้น 0.20 mg/mL มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม เท่ากับ 86.548 μ gAE

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วย mgAE/g

$$\begin{aligned} \text{ส่วนสกัดตัวอย่าง } 0.20 \text{ mg} & \quad \text{มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี} \quad 86.548 \text{ } \mu\text{gAE} \\ \text{ถ้าส่วนสกัดตัวอย่าง } 1,000 \text{ mg} & \quad \text{มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซี} \quad \frac{86.548 \text{ } \mu\text{gAE} \times 1,000 \text{ mg}}{0.20 \text{ mg}} \\ & = 432.74 \text{ mgAE/g} \end{aligned}$$

ดังนั้น ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม เท่ากับ 432.74 mgAE/g

นำค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ในของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

4.6 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ ในหน่วย mgAE/g

ตารางภาคผนวก ง-3 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล จากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ส่วนสกัดหยาบ ชั้นเอทานอลจากปีบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม mgAE/g				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
ดอก	0.20	432.74	443.23	453.71	443.23	10.48
ใบ	0.20	316.61	327.90	335.97	326.83	9.72
กิ่ง	0.20	376.29	371.45	350.48	366.08	13.72
ฝักส่วนใน	0.20	497.26	511.77	482.74	497.26	14.52
ฝักส่วนนอก	0.20	389.19	405.32	382.74	392.42	11.63
เมล็ด	0.20	665.00	650.48	679.52	665.00	14.52

ภาคผนวก จ

การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดยวิธี DPPH free radical scavenging

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

5.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

5.1.1 สารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 mM (20 µg/mL) โดยชั่ง DPPH 10 mg ละลายในเมทานอล 500 mL

5.1.2 สารมาตรฐาน Gallic acid, Quercetin และ Ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL ในเมทานอล โดยชั่งสารมาตรฐานอย่างละ 0.1 mg ละลายในเมทานอล 1 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 2 - 0.016 µg/mL เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

5.1.3 สารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5 mg/mL ในเมทานอล ปริมาตร 0.2 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 500-15.625 µg/mL

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

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 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ควายาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)

5.3 คำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% 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

ตัวอย่างการคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ

ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ ที่ความเข้มข้น 0.500 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.023 (B) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.466 (A)

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

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } \% \text{ DPPH free radical inhibition} &= [(0.466-0.023)/0.466] \times 100 \\ &= 95.064 \end{aligned}$$

ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL ครั้งที่ 1 มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 95.06

นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ

5.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซีติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid)

ตารางภาคผนวก จ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

ความเข้มข้น ของวิตามินซี ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
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)				

ตารางภาคผนวก จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของ
สารมาตรฐานวิตามินซี

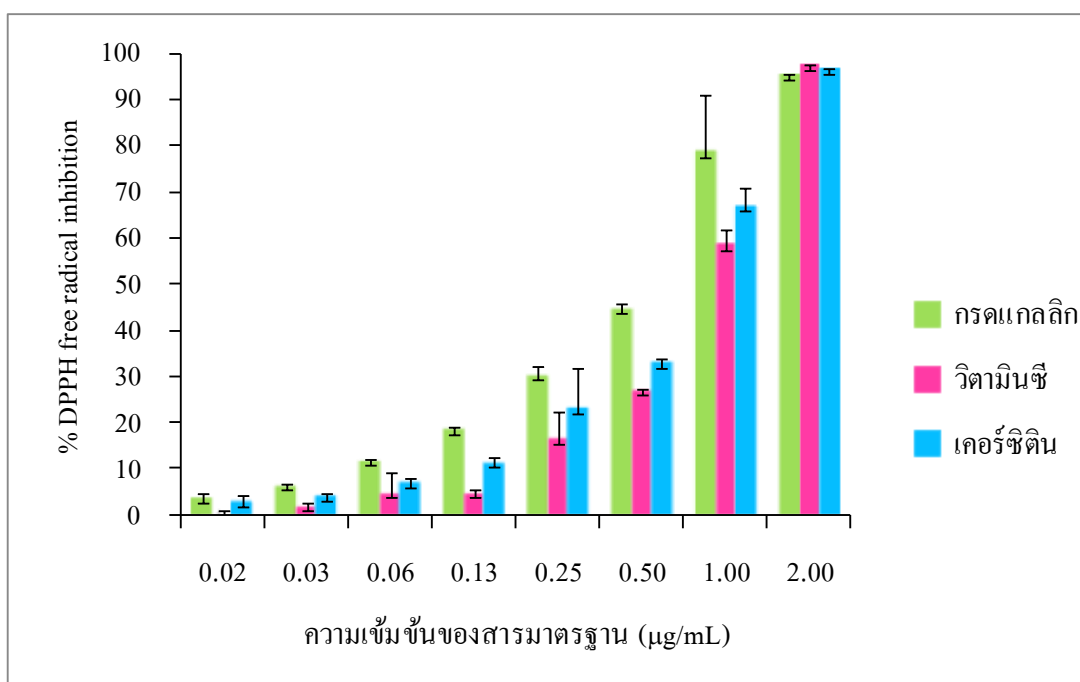
ความเข้มข้น ของวิตามินซี (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.02	0.440	0.444	0.444	1.12	0.22	0.22	0.52	0.52
0.03	0.440	0.435	0.435	1.12	2.25	2.25	1.87	0.65
0.06	0.401	0.436	0.434	9.89	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)				

ตารางภาคผนวก จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของ
สารมาตรฐานเคอร์ซีติน

ความเข้มข้น ของเคอร์ซีติน (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)				

ตารางภาคผนวก จ-4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน
กรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซีติน

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH free radical inhibition		
	กรดแกลลิก	วิตามินซี	เคอร์ซีติน
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



ภาพภาคผนวก จ-1 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging
ของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก วิตามินซี และเคอร์ซีติน

5.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปีบ

ตารางภาคผนวก จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ
ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ

ความเข้มข้นของ ส่วนสกัดหยาบ ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
3.91	0.462	0.466	0.467	0.86	0.00	-0.21	0.21	0.57
7.81	0.457	0.459	0.461	1.93	1.50	1.07	1.50	0.43
15.63	0.445	0.448	0.448	4.51	3.86	3.86	4.08	0.37
31.25	0.419	0.415	0.414	10.09	10.94	11.16	10.73	0.57
62.50	0.354	0.353	0.354	24.03	24.25	24.03	24.11	0.12
125.00	0.236	0.214	0.234	49.36	54.08	49.79	51.07	2.61
250.00	0.074	0.065	0.066	84.12	86.05	85.84	85.34	1.06
500.00	0.023	0.023	0.024	95.06	95.06	94.85	94.99	0.12
Control	0.467	0.466	0.466	(ค่าเฉลี่ย = 0.466)				

ตารางภาคผนวก จ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ
ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบของปีบ

ความเข้มข้นของ ส่วนสกัดหยาบ ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
3.91	0.442	0.446	0.445	4.329	3.46	3.68	3.82	0.45
7.81	0.421	0.421	0.421	8.87	8.87	8.87	8.87	0.00
15.63	0.368	0.374	0.370	20.35	19.05	19.91	19.77	0.66
31.25	0.275	0.283	0.280	40.48	38.74	39.39	39.54	0.87
62.50	0.138	0.127	0.127	70.13	72.51	72.51	71.72	1.37
125.00	0.036	0.037	0.036	92.21	91.99	92.21	92.14	0.12
250.00	0.034	0.034	0.034	92.64	92.64	92.64	92.64	0.00
500.00	0.023	0.028	0.029	95.02	93.94	93.72	94.23	0.70
Control	0.464	0.46	0.463	(ค่าเฉลี่ย = 0.462)				

ตารางภาคผนวก จ-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ
ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากกิ่งของปีบ

ความเข้มข้นของ ส่วนสกัดหยาบ ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
3.91	0.500	0.508	0.510	1.96	0.39	0.00	0.78	1.04
7.81	0.498	0.506	0.507	2.35	0.78	0.59	1.24	0.97
15.63	0.489	0.498	0.499	4.12	2.35	2.16	2.88	1.08
31.25	0.486	0.487	0.485	4.71	4.51	4.90	4.71	0.20
62.50	0.444	0.445	0.441	12.94	12.75	13.53	13.07	0.41
125.00	0.371	0.373	0.374	27.25	26.86	26.67	26.93	0.30
250.00	0.260	0.258	0.255	49.02	49.41	50.00	49.48	0.49
500.00	0.082	0.084	0.104	83.92	83.53	79.61	82.35	2.39
Control	0.512	0.508	0.510	(ค่าเฉลี่ย = 0.510)				

ตารางภาคผนวก จ-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ
ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในของปีบ

ความเข้มข้นของ ส่วนสกัดหยาบ ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
3.91	0.809	0.812	0.793	0.49	0.12	2.46	1.03	1.26
7.81	0.794	0.797	0.798	2.34	1.97	1.85	2.05	0.26
15.63	0.755	0.756	0.758	7.13	7.01	6.77	6.97	0.19
31.25	0.669	0.661	0.663	17.71	18.70	18.45	18.29	0.51
62.50	0.485	0.477	0.450	40.34	41.33	44.65	42.11	2.26
125.00	0.118	0.115	0.107	85.49	85.85	86.84	86.06	0.70
250.00	0.039	0.039	0.038	95.20	95.20	95.33	95.24	0.07
500.00	0.038	0.039	0.040	95.33	95.20	95.08	95.20	0.12
Control	0.812	0.813	0.764	(ค่าเฉลี่ย = 0.813)				

ตารางภาคผนวก จ-9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ
ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนนอกของปีบ

ความเข้มข้นของ ส่วนสกัดหยาบ ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
3.91	0.812	0.817	0.820	1.22	0.61	0.24	0.69	0.49
7.81	0.804	0.810	0.810	2.19	1.46	1.46	1.70	0.42
15.63	0.782	0.773	0.782	4.87	5.96	4.87	5.23	0.63
31.25	0.718	0.721	0.724	12.65	12.29	11.92	12.29	0.36
62.50	0.602	0.600	0.600	26.76	27.01	27.01	26.93	0.14
125.00	0.403	0.394	0.398	50.97	52.07	51.58	51.54	0.55
250.00	0.078	0.071	0.066	90.51	91.36	91.97	91.28	0.73
500.00	0.036	0.035	0.034	95.62	95.74	95.86	95.74	0.12
Control	0.826	0.815	0.826	(ค่าเฉลี่ย = 0.822)				

ตารางภาคผนวกจ-10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ
ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของปีบ

ความเข้มข้นของ ส่วนสกัดหยาบ ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm			% DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
3.91	0.454	0.456	0.451	2.78	2.36	3.43	2.86	0.54
7.81	0.430	0.436	0.440	7.92	6.64	5.78	6.78	1.08
15.63	0.397	0.395	0.397	14.99	15.42	14.99	15.13	0.25
31.25	0.333	0.331	0.336	28.69	29.12	28.05	28.62	0.54
62.50	0.212	0.218	0.217	54.60	53.32	53.53	53.82	0.69
125.00	0.060	0.061	0.061	87.15	86.94	86.94	87.01	0.12
250.00	0.020	0.021	0.022	95.72	95.50	95.29	95.50	0.21
500.00	0.018	0.019	0.020	96.15	95.93	95.72	95.93	0.21
Control	0.469	0.464	0.468	(ค่าเฉลี่ย = 0.467)				

ภาคผนวก จ

การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส
(Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay)

โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

6.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

6.1.1 การเตรียม Phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 50.0 mM โดยผสมสารดังต่อไปนี้

6.1.1.1 เตรียมสารละลาย A และ B

A: เตรียม Mono basic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 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)

6.1.1.2 นำสารละลาย A ปริมาตร 51.0 mL และสารละลาย B ปริมาตร 49.0 mL ผสมกัน วัด pH ให้ได้ 6.8 ถ้าไม่ได้ให้ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl เมื่อได้ pH 6.8 แล้วให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200.0 mL (0.1 M) แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50.0 mM

6.1.2 สารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.00 mg/mL (เตรียมกรดโคจิก 20.00 mg/mL: ชั่งกรดโคจิก 20.0 mg ละลายในเมทานอล 1.0 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 20-0.15 mg/mL)

6.1.3 เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ละลายใน Phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 800 U/mL

6.1.4 สารละลาย L-Tyrosine ความเข้มข้น 3.0 mM ละลายใน Phosphate buffer pH 6.8 (ชั่ง L-Tyrosine 5.4 mg ละลายใน Phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 50.0 mM ปริมาตร 10.0 mL)

6.1.5 สารละลายตัวอย่าง ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 20-0.15 mg/mL

6.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.00 mg/mL) ปริมาตร 20.0 μL กับสารละลาย phosphate buffer (pH 6.8) ความเข้มข้น 50.0 mM ปริมาตร 120.0 μL และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 800 U/mL ใน Phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 20.0 μL ลงในงานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-Tyrosine ความเข้มข้น 3.0 mM ปริมาตร 40.0 μL ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader

6.3 ตัวคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

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

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของป๊อบ ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.226 (A) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.002 (B)

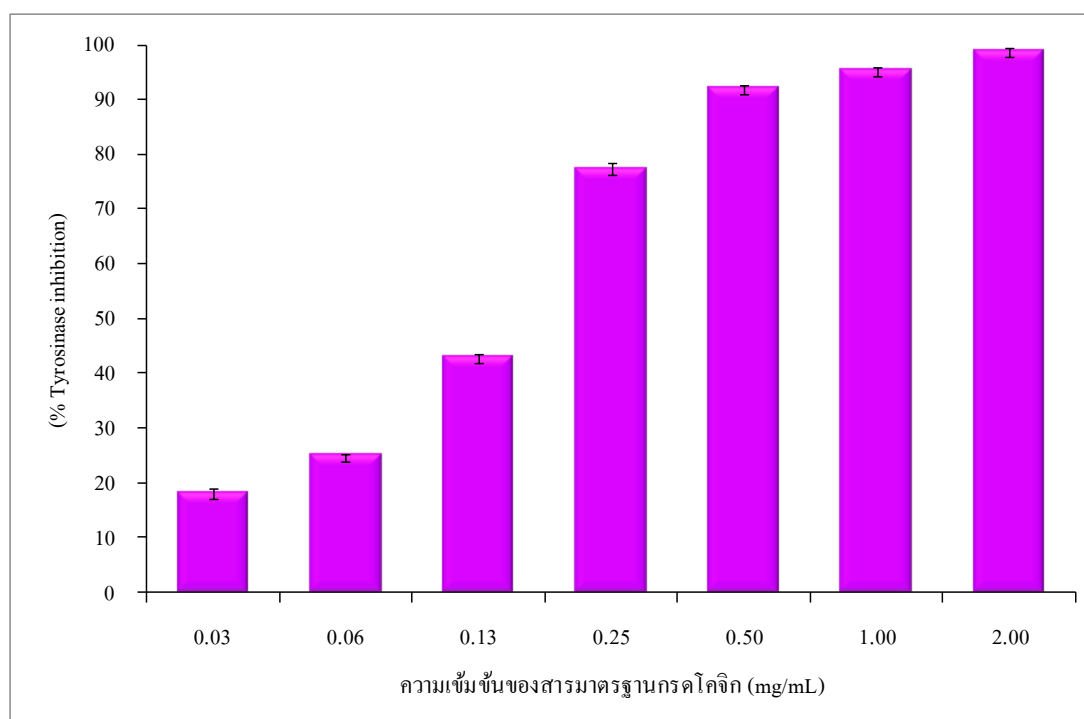
จากสมการ	$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$
แทนค่า	$= [(0.226-0.002)/0.226] \times 100$
	$= 99.12$

ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของป๊อบ ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL ครั้งที่ 1 มีร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 99.12

6.4 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

ตารางภาคผนวก ก-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

ความเข้มข้น ของกรดโคจิก (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.099	0.100	0.101	18.85	18.03	17.21	18.03	0.82
0.06	0.091	0.092	0.092	25.41	24.59	24.59	24.86	0.47
0.13	0.070	0.069	0.070	42.62	43.44	42.62	42.90	0.47
0.25	0.026	0.028	0.029	78.69	77.05	76.23	77.32	1.25
0.50	0.010	0.009	0.010	91.80	92.62	91.80	92.08	0.47
1.00	0.005	0.006	0.006	95.90	95.08	95.08	95.36	0.47
2.00	0.001	0.002	0.001	99.18	98.36	99.18	98.91	0.47
Control (A)	0.123	0.121	0.122	(ค่าเฉลี่ย = 0.122)				



ภาพภาคผนวก ก-1 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต

6.5 ตารางค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของปืบ

ตารางภาคผนวก จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปืบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.115	0.117	0.116	55.08	54.30	54.69	54.69	0.39
0.06	0.094	0.093	0.092	63.28	63.67	64.06	63.67	0.39
0.13	0.072	0.073	0.073	71.88	71.48	71.48	71.61	0.23
0.25	0.055	0.058	0.055	78.52	77.34	78.52	78.13	0.68
0.50	0.045	0.043	0.045	82.42	83.20	82.42	82.68	0.45
1.00	0.028	0.028	0.03	89.06	89.06	88.28	88.80	0.45
2.00	0.026	0.027	0.026	89.84	89.45	89.84	89.71	0.23
Control	0.258	0.255	0.255	(ค่าเฉลี่ย = 0.256)				

ตารางภาคผนวก จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากจากใบของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.102	0.103	0.103	58.87	58.47	58.47	58.60	0.23
0.06	0.090	0.092	0.088	63.71	62.90	64.52	63.71	0.81
0.13	0.071	0.070	0.069	71.37	71.77	72.18	71.77	0.40
0.25	0.055	0.054	0.054	77.82	78.23	78.23	78.09	0.23
0.50	0.034	0.031	0.034	86.29	87.50	86.29	86.69	0.70
1.00	0.016	0.018	0.019	93.55	92.74	92.34	92.88	0.62
2.00	0.001	0.001	0.003	99.60	99.60	98.79	99.33	0.47
Control	0.243	0.254	0.246	(ค่าเฉลี่ย = 0.248)				

ตารางภาคผนวก ก-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากกิ่งของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.135	0.137	0.135	47.27	46.48	47.27	47.01	0.45
0.06	0.122	0.121	0.124	52.34	52.73	51.56	52.21	0.60
0.13	0.103	0.105	0.106	59.77	58.98	58.59	59.11	0.60
0.25	0.086	0.087	0.088	66.41	66.02	65.63	66.02	0.39
0.50	0.064	0.067	0.066	75.00	73.83	74.22	74.35	0.60
1.00	0.030	0.032	0.028	88.28	87.50	89.06	88.28	0.78
2.00	0.009	0.008	0.007	96.48	96.88	97.27	96.88	0.39
Control	0.252	0.257	0.258	(ค่าเฉลี่ย = 0.256)				

ตารางภาคผนวก จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.062	0.063	0.063	75.69	75.29	75.29	75.42	0.23
0.06	0.049	0.048	0.048	80.78	81.18	81.18	81.05	0.23
0.13	0.034	0.033	0.036	86.67	87.06	85.88	86.54	0.60
0.25	0.021	0.021	0.022	91.76	91.76	91.37	91.63	0.23
0.50	0.014	0.013	0.016	94.51	94.90	93.73	94.38	0.60
1.00	0.008	0.008	0.009	96.86	96.86	96.47	96.73	0.23
2.00	0.009	0.009	0.008	96.47	96.47	96.86	96.60	0.23
Control	0.261	0.251	0.253	(ค่าเฉลี่ย = 0.255)				

ตารางภาคผนวก จ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนนอกของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.093	0.095	0.095	61.09	60.25	60.25	60.53	0.48
0.06	0.075	0.077	0.074	68.62	67.78	69.04	68.48	0.64
0.13	0.062	0.061	0.064	74.06	74.48	73.22	73.92	0.64
0.25	0.040	0.039	0.039	83.26	83.68	83.68	83.54	0.24
0.50	0.027	0.027	0.024	88.70	88.70	89.96	89.12	0.72
1.00	0.022	0.024	0.022	90.79	89.96	90.79	90.52	0.48
2.00	0.015	0.011	0.010	93.72	95.40	95.82	94.98	1.11
Control	0.239	0.237	0.240	(ค่าเฉลี่ย = 0.239)				

ตารางภาคผนวก ก-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-Tyrosine เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากจากเมล็ดของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.065	0.065	0.064	71.24	71.24	71.68	71.39	0.26
0.06	0.050	0.048	0.049	773.88	78.76	78.32	78.32	0.44
0.13	0.039	0.038	0.037	82.74	83.19	83.63	83.19	0.44
0.25	0.026	0.025	0.024	88.50	88.94	89.38	88.94	0.44
0.50	0.018	0.020	0.018	92.04	91.15	92.04	91.74	0.51
1.00	0.009	0.008	0.010	96.02	96.46	95.58	96.02	0.44
2.00	0.002	0.002	0.004	99.12	99.12	98.23	98.82	0.51
Control	0.224	0.228	0.227	(ค่าเฉลี่ย = 0.226)				

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส
(Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

7.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

7.1.1 การเตรียม phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 50.0 mM โดยผสมสารดังต่อไปนี้

7.1.1.1 เตรียมสารละลาย A และ B

A: เตรียม Mono basic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.2 M

(stock A : ชั่ง NaH_2PO_4 15.601 g (MW = 156.01 g/mol) ละลายในน้ำ 500.0 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 500.0 mL)

7.1.1.2 นำสารละลาย A ปริมาตร 51.0 mL และสารละลาย B ปริมาตร 49.0 mL มาผสมกัน วัด pH ให้ได้ 6.8 ถ้าไม่ได้ให้ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl เมื่อได้ pH 6.8 แล้วให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200.0 mL (0.1 M) แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50.0 mM

7.1.2 สารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.00 mg/mL (เตรียมกรดโคจิก 20.00 mg/mL: ชั่งกรดโคจิก 20.0 mg ละลายในเมทานอล 1.0 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 20-0.15 mg/mL)

7.1.3 เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ละลายใน Phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 400 U/mL

7.1.4 สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 3.0 mM ละลายใน phosphate buffer pH 6.8 (ชั่ง L-DOPA 5.4 mg ละลายใน Phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 50.0 mM ปริมาตร 10.0 mL)

7.1.5 สารละลายตัวอย่าง ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 20-0.15 mg/mL

7.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 mg/mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 20.00 mg/mL) ปริมาตร 20.0 μL กับสารละลาย Phosphate buffer (pH 6.8) ความเข้มข้น 50.0 mM ปริมาตร 120.0 μL และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 400 U/mL ใน Phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 20.0 μL ลงในงานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA

ความเข้มข้น 3.0 mM ปริมาตร 40.0 μ L ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader

7.3 ตัวคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

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

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตัวอย่างการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของปีบ ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.224 (A) และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.094 (B)

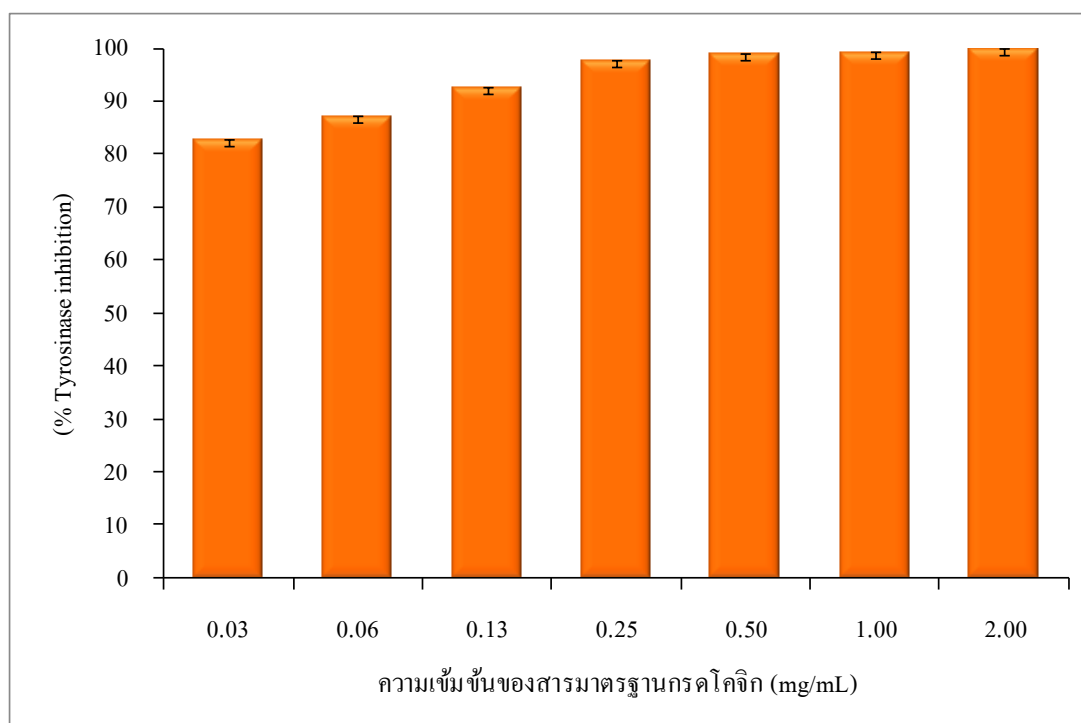
จากสมการ	$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$
แทนค่า	$= [(0.224-0.094)/0.224] \times 100$
	$= 58.04$

ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL ครั้งที่ 1 มีร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 58.04

7.4 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

ตารางภาคผนวก ช-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

ความเข้มข้นของกรดโคจิก (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.03	0.039	0.038	0.040	82.67	83.11	82.22	82.67	0.44
0.06	0.028	0.029	0.030	87.56	87.11	86.67	87.11	0.44
0.13	0.017	0.017	0.017	92.44	92.44	92.44	92.44	0.00
0.25	0.006	0.005	0.006	97.33	97.78	97.33	97.48	0.26
0.50	0.004	0.001	0.004	98.22	99.56	98.22	98.67	0.77
1.00	0.002	0.002	0.002	99.11	99.11	99.11	99.11	0.00
2.00	0.001	0.000	0.001	99.56	100.00	99.56	99.70	0.26
Control (A)	0.219	0.223	0.233	(ค่าเฉลี่ย = 0.225)				



ภาพภาคผนวก ช-1 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

7.5 ตารางค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากส่วนต่างๆของปีบ

ตารางภาคผนวก ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.182	0.182	0.183	1.62	1.62	1.08	1.44	0.31
0.06	0.181	0.184	0.179	2.16	0.54	3.24	1.98	1.36
0.13	0.177	0.178	0.175	4.32	3.78	5.41	4.50	0.83
0.25	0.166	0.169	0.163	10.27	8.65	11.89	10.27	1.62
0.50	0.155	0.153	0.157	16.22	17.30	15.14	16.22	1.08
1.00	0.123	0.123	0.122	33.51	33.51	34.05	33.69	0.31
2.00	0.087	0.090	0.090	52.97	51.35	51.35	51.89	0.94
Control	0.186	0.183	0.186	(ค่าเฉลี่ย = 0.185)				

ตารางภาคผนวก ข-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากจากใบของปีป

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.210	0.212	0.210	1.41	0.47	1.41	1.10	0.54
0.06	0.206	0.202	0.205	3.29	5.16	3.76	4.07	0.98
0.13	0.202	0.205	0.203	5.16	3.76	4.69	4.54	0.72
0.25	0.193	0.191	0.190	9.39	10.33	10.80	10.17	0.72
0.50	0.178	0.174	0.178	16.43	18.31	16.43	17.06	1.08
1.00	0.157	0.155	0.157	26.29	27.23	26.29	26.60	0.54
2.00	0.136	0.139	0.135	36.15	34.74	36.62	35.84	0.98
Control	0.211	0.210	0.217	(ค่าเฉลี่ย = 0.213)				

ตารางภาคผนวก ข-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากกิ่งของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.206	0.208	0.205	2.83	1.89	3.30	2.67	0.72
0.06	0.201	0.200	0.197	5.19	5.66	7.08	5.97	0.98
0.13	0.196	0.194	0.197	7.55	8.49	7.08	7.70	0.72
0.25	0.185	0.185	0.186	12.74	12.74	12.26	12.58	0.27
0.50	0.167	0.165	0.166	21.23	22.17	21.70	21.70	0.47
1.00	0.131	0.133	0.131	38.21	37.26	38.21	37.89	0.54
2.00	0.085	0.086	0.087	59.91	59.43	58.96	59.43	0.47
Control	0.211	0.209	0.216	(ค่าเฉลี่ย = 0.212)				

ตารางภาคผนวก ข-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนในของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.216	0.214	0.214	0.92	1.83	1.83	1.53	0.53
0.06	0.213	0.213	0.212	2.29	2.29	2.75	2.45	0.26
0.13	0.201	0.202	0.201	7.80	7.34	7.80	7.65	0.26
0.25	0.188	0.187	0.185	13.76	14.22	15.14	14.37	0.70
0.50	0.164	0.161	0.161	24.77	26.15	26.15	25.69	0.79
1.00	0.137	0.14	0.139	37.16	35.78	36.24	36.39	0.70
2.00	0.089	0.09	0.087	59.17	58.72	60.09	59.33	0.70
Control	0.216	0.218	0.219	(ค่าเฉลี่ย = 0.218)				

ตารางภาคผนวก ช-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากฝักส่วนนอกของปืบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.199	0.198	0.200	0.50	1.00	0.00	0.50	0.50
0.06	0.197	0.198	0.198	1.50	1.00	1.00	1.17	0.29
0.13	0.192	0.194	0.192	4.00	3.00	4.00	3.67	0.58
0.25	0.179	0.178	0.180	10.50	11.00	10.00	10.50	0.50
0.50	0.158	0.158	0.156	21.00	21.00	22.00	21.33	0.58
1.00	0.133	0.132	0.131	33.50	34.00	34.50	34.00	0.50
2.00	0.089	0.091	0.089	55.50	54.50	55.50	55.17	0.58
Control	0.201	0.201	0.199	(ค่าเฉลี่ย = 0.200)				

ตารางภาคผนวก ข-7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากเมล็ดของปีบ

ความเข้มข้น ส่วนสกัดหยาบ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.03	0.213	0.213	0.214	4.91	4.91	4.46	4.76	0.26
0.06	0.205	0.204	0.204	8.48	8.93	8.93	8.78	0.26
0.13	0.195	0.193	0.192	12.95	13.84	14.29	13.69	0.68
0.25	0.176	0.174	0.173	21.43	22.32	22.77	22.17	0.68
0.50	0.150	0.147	0.152	33.04	34.38	32.14	33.18	1.12
1.00	0.122	0.123	0.121	45.54	45.09	45.98	45.54	0.45
2.00	0.094	0.094	0.096	58.04	58.04	57.14	57.74	0.52
Control	0.225	0.226	0.221	(ค่าเฉลี่ย = 0.224)				