รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดย่อยจากใบเสม็ดแดงในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

Antioxidant activities of *Syzygium gratum* (Wight) S.N. Mitra var. gratum subextracts from Ban Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation)

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802022

สัญญาเลขที่ 79/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดย่อยจากใบเสม็ดแดงในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

Antioxidant activities of *Syzygium gratum* (Wight) S.N. Mitra var. gratum subextracts from Ban Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation)

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข

กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๑

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร
(Executive Summary)

ข้าพเจ้า อ.ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดย่อยจากใบเสม็ดแดงในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

(ภาษาอังกฤษ) Antioxidant activities of Syzygium gratum (Wight) S.N. Mitra var. gratum subextracts from Ban Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation)

รหัสโครงการ 2559A10802022 / สัญญาเลขที่ 79/2559 ได้รับงบประมาณทั้งสิ้น 550,000 บาท (ห้าแสนห้าหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 3 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 27 สิงหาคม พ.ศ. 2561)

บทคัดย่อ

เสม็ดแดงเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี พืชชนิดนี้ถูกใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านสำหรับป้องกันและรักษาโรคได้หลายโรค มีรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งทำในส่วนสกัดน้ำร้อนแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาถึงสารที่เป็นองค์ประกอบในเสม็ดแดงที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนสกัดย่อยและแฟรกชันย่อยต่างๆ ของใบเสม็ดแดงหลังจากที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์โดยอาศัยคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวนำทางในการทำบริสุทธิ์สาร และเปรียบเทียบฤทธิ์ดังกล่าวกับสารสกัดหยาบ จากผลการทดลองพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด (151.458 ± 1.360 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของส่วนสกัด) และยังสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (EC50 = 0.071 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ค่อนข้างดี โดยมีค่า FRAP เท่ากับ 890.885 ± 4.724 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox/กรัมของส่วนสกัด ดังนั้น ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจึงถูกเลือกที่จะนำไปแยกด้วยคอลัมน์ต่อไป หลังจากผ่านคอลัมน์แล้ว แฟรกชันที่มีฤทธิ์ยังคงมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงขึ้น (94.36%) และมีค่า FRAP เท่ากับ 767.373 ± 3.272 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox/กรัมของส่วนสกัด

Output / Outcome

- จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่ได้จากใบเสม็ดแดงมีปริมาณหลังการสกัด (%yield) มากที่สุด ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระทั้งฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนที่ดีมาก และความสามารถนี้ยังคงปรากฏให้เห็นแม้ว่าจะผ่านการแยกและทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบ

คอลัมน์แล้วก็ตาม จึงน่าจะนำแฟรกชันที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยนี้ไปทำการศึกษาองค์ประกอบและคุณลักษณะทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกครั้งหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบกับส่วนสกัดหยาบตอนเริ่มต้น

- งานวิจัยนี้ทำให้นิสิตระดับป. โท สำเร็จการศึกษา 1 คน
- ทำให้มีผลงานวิจัยเรื่อง Total phenolic content and antioxidant activities from *Barrington augusta* Kurz. leaf extract ได้รับการตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ the 7th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research - Asia ปี 2015 หน้า 34-42 ณ โรงแรม The Empress จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ให้เข้าไปเก็บพืชตัวอย่างในการทำวิจัยมาตั้งแต่ต้นจนทำให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นอกจากนี้ยังต้องขอบคุณนิสิตชั้นปีที่ ๔ ของภาควิชาชีวเคมี และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และสาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่ร่วมมือร่วมใจกันในการทำวิจัยจนทำให้ได้ผลการวิจัยอันน่าพึงพอใจ ตลอดจนคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในโครงการวิจัยนี้

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข

ผู้วิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดย่อยจากใบเสม็ดแดงในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Antioxidant activities of *Syzygium gratum* (Wight) S.N. Mitra var. gratum subextracts from Ban Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation)

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

ผู้วิจัยร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

บทคัดย่อ

เสม็ดแดงเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี พืชชนิดนี้ถูกใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านสำหรับป้องกันและรักษาโรคได้หลายโรค มีรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งทำในส่วนสกัดน้ำร้อนแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี แต่ก็ยังไม่มีการศึกษาถึงสารที่เป็นองค์ประกอบในเสม็ดแดงที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนสกัดย่อยและแฟรกชันย่อยต่างๆ ของใบเสม็ดแดงหลังจากที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์โดยอาศัยคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวนำทางในการทำบริสุทธิ์สาร และเปรียบเทียบฤทธิ์ดังกล่าวกับสารสกัดหยาบ จากผลการทดลองพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด (151.458 ± 1.360 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของส่วนสกัด) และยังสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (EC_{50} = 0.071 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ค่อนข้างดี โดยมีค่า FRAP เท่ากับ 890.885 ± 4.724 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox/กรัมของส่วนสกัด ดังนั้น ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจึงถูกเลือกที่จะนำไปแยกด้วยคอลัมน์ต่อไป หลังจากผ่านคอลัมน์แล้ว แฟรกชันที่มีฤทธิ์ยังคงมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงขึ้น (94.36%) และมีค่า FRAP เท่ากับ 767.373 ± 3.272 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox/กรัมของส่วนสกัด

Abstract

Syzygium gratum (Wight) S.N. Mitra var. gratum (Sameddang) is often found in the Eastern region of Thailand. It is an indigenous plant collected from Ban Ang-Ed Official Community Forest Project, Chantaburi province. It has been used in healthcare to prevent several diseases by traditional folklore. In addition, a previous report of this plant in form of the hot water extract showed high antioxidant activities, but there is still no study of the antioxidant activity of bioactive compound from this plant. Therefore, this work aimed to evaluate the bioactive compounds by determining the total phenolic content, and the antioxidant activity from sub-extracts and sub-fractions after purification via TLC and column chromatography compared with the crude extract. For the result of *S. gratum*, ethyl acetate extract had the highest total phenolic contents with 151.458 ± 1.360 mg GAE/g extract, and it could remarkably inhibit DPPH radical (EC_{50} = 0.071 ± 0.002 mg/mL). In addition, it was also expressed the highest FRAP value of 890.885 ± 4.724 mg TE/g extract. The results suggested that the ethyl acetate extract showed high antioxidant activity. Thus, this extract was selected to further isolate by column chromatography. After isolation, active fractions from *S. gratum* had still high DPPH radical scavenging activity (94.36%) and FRAP value of 767.373 ± 3.272 mg TE/g extract.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 3 ผลการวิจัย	13
บทที่ 4 อภิปราย และสรุปผลการทดลอง	27
รายงานสรุปการเงิน	29
บรรณานุกรม	30
ประวัตินักวิจัย	33

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 3-1	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดเอทานอลจากใบเสม็ดแดง	14
รูปที่ 3-2	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดย่อยเฮกเซนจากใบเสม็ดแดง	14
รูปที่ 3-3	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบเสม็ดแดง	15
รูปที่ 3-4	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดย่อยน้ำจากใบเสม็ดแดง	15
รูปที่ 3-5	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดใบเสม็ดแดงที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	16
รูปที่ 3-6	ค่า FRAP ของส่วนสกัดต่างๆ จากใบเสม็ดแดงที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	18
รูปที่ 3-7	TLC ของแฟรกชันเอทิลอะซิเตทจากใบเสม็ดแดง	19
รูปที่ 3-8	TLC ของแฟรกชันต่างๆ หลังจากผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 1 เมื่อ แฟรกชัน FBA1 ถูกรวมโดยใช้ SBA1-4, แฟรกชัน FBA2 ถูกรวมโดยใช้ SBA5, แฟรกชัน FBA3 ถูกรวมโดยใช้ SBA6-7, แฟรกชัน FBA4 ถูกรวมโดยใช้ SBA8-10, แฟรกชัน FBA5 ถูกรวมโดยใช้ SBA11-16, แฟรกชัน FBA6 ถูกรวมโดยใช้ SBA17-20, แฟรกชัน FBA7 ถูกรวมโดยใช้ SBA21-22 และ แฟรกชัน FBA8 ถูกรวมโดยใช้ SBA23-24	19
รูปที่ 3-9	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG1 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	20
รูปที่ 3-10	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG2 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	21
รูปที่ 3-11	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG3 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	21
รูปที่ 3-12	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG4 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	22
รูปที่ 3-13	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG5 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	22
รูปที่ 3-14	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG6 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	23
รูปที่ 3-15	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG7 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	23
รูปที่ 3-16	สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG8 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	24
รูปที่ 3-17	ค่า FRAP ของแต่ละแฟรกชันที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	26

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	ปริมาณสารสกัดเอทานอลและส่วนสกัดย่อยต่างๆ และ %yield จากแต่ละส่วนสกัดของใบเสม็ดแดง	13
ตารางที่ 3-2	ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนสกัดต่างๆ ของใบเสม็ดแดง และค่า EC_{50} ของการกำจัดอนุมูล	17
ตารางที่ 3-3	ค่า FRAP ของส่วนสกัดต่างๆ จากใบเสม็ดแดงที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	17
ตารางที่ 3-4	น้ำหนักแห้งและ %yield ของแต่ละส่วนสกัดย่อยจากใบเสม็ดแดง ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์	20
ตารางที่ 3-5	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของแต่ละแฟรกชันย่อย	24
ตารางที่ 3-6	ค่า FRAP ของแต่ละแฟรกชันย่อยที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	25

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ปัจจุบันประชาชนทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยหันมานิยมใช้สมุนไพรทั้งในแง่เป็นยา อาหาร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพอื่นๆ แม้แต่องค์การอนามัยโลกก็เริ่มที่จะตระหนักถึงความสำคัญของการแพทย์พื้นบ้านของแต่ละประเทศในระบบบริการสาธารณสุข โดยมีการหยิบยกขึ้นพิจารณาตั้งแต่สมัยประชุมสมัชชาอนามัยโลก และมีมติชัดเจนเรื่องการส่งเสริมบทบาทของการแพทย์พื้นบ้าน (Traditional Medicine) ของแต่ละประเทศ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการกำหนดนโยบายไว้อย่างชัดเจน (Banmonan et al., 1983)

ประเทศไทยนิยาม “สมุนไพร” ว่าหมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา (นโยบายแห่งชาติด้านยา พ.ศ. 2536) ส่วนพ.ร.บ.คุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย (พ.ศ. 2542) นิยามไว้ว่า “สมุนไพร” หมายถึง สัตว์ จุลชีพ ธาตุวัตถุ สารสกัดดั้งเดิมจากพืชหรือสัตว์ที่ใช้ หรือแปรสภาพ หรือผสม หรือปรุง เป็นยาหรืออาหาร เพื่อการตรวจวินิจฉัย บำบัด รักษา หรือป้องกันโรค หรือเสริมสุขภาพร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์ (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2546) พืชสมุนไพรหลายชนิดมีข้อมูลที่ค่อนข้างชัดเจนซึ่งสามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลทางยาต่างๆ เช่น German Commission E, WHO monograph, Thai Herbal Pharmacopoeia หรือ National Center for Complementary and Alternative Medicine ซึ่งสมุนไพรในกลุ่มนี้มีข้อมูลทางคลินิกสนับสนุน แต่ก็ยังมีสมุนไพรอยู่อีกมากที่ใช้สืบทอดกันมาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นหรือตำรับของหมอชาวบ้านในท้องถิ่นนั้นๆ ที่ให้ผลในการรักษา แต่ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์หรือทางคลินิกสนับสนุน

พืชสมุนไพรประกอบด้วยสารพฤกษเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ สเตียรอล (sterols) เทอร์ปีน (terpenes) และลิกแนน ไกลโคไซด์ (lignan glycosides) และจากรายงานของ Andarwulan และคณะ (2010) พบว่าในพืชสมุนไพรส่วนใหญ่มีฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์

จะเห็นได้ว่ารายงานเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีในพืชสมุนไพร เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงจากอนุมูลอิสระที่เข้าไปทำลายเซลล์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดต่างๆ มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็งตลอดจนโรคเรื้อรังต่างๆ งานวิจัยของ Fuhrman และคณะ (2005) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำทับทิมว่าสามารถลดการสะสมของ

คอเลสเตอรอลโดยการกด oxidized-LDL และการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในเซล์แมคโครฟาจ นอกจากนี้ Pothitirat และคณะ (2009) ยังพบว่าในเปลือกของพืชบางชนิดยังมีสารแทนนินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส HIV และ herpes simplex virus มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สามารถลดความเสี่ยงของการเป็นมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีสารประกอบในกลุ่ม xanthone ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย รา และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ที่สำคัญยังช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human leukemia HL60 cells) โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis และป้องกันการออกซิเดชันของ LDL หรือบางชนิดก็สามารถยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ myeloperoxidase และมีบทบาทสำคัญในการลดการอักเสบ (Zeraik และคณะ, 2011) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Hossain และ Rahman (2011) ยังพบว่าส่วนสกัดเมทานอลในสมุนไพรบางอย่างยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีและมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีในสมุนไพรเหล่านั้น

เสม็ดแดงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium gratum* (Wight) S.N. Mitra var. gratum ชื่ออื่นที่ใช้เรียก คือ ขะเม็ก (กุดบาท) หรือเม็ก เจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ชอบแสงแดดรำไร เจริญได้ดีในดินแทบทุกชนิด มักพบอยู่ตามริมห้วย ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด เม็กเป็นไม้พุ่มต้นไม่ผลัดใบ เปลือกสีน้ำตาลแดงแตกสะเก็ดแผ่นบางๆ โคนต้น ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้าม ลักษณะเหมือนหอก ขอบใบเรียบปลายใบแหลม มีรสฝาดอมเปรี้ยว ดอกออกเป็นช่อเล็กๆ สีเหลืองอ่อน ออกที่ปลายยอด ออกดอกในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน ผลมีลักษณะกลมสีขาวมีขนาดเล็ก น้ำมันจากใบมีกลิ่นคล้ายการบูร เรียกว่า น้ำมันเขียวใช้นวดแก้เคล็ดคัดยอก แก้หมัดเหา นำสำลีชุบอุดฟันแก้ปวดฟันได้ มีคุณค่าทางอาหารคือ สามารถกินเป็นยาขับเสมหะ แก้หลอดลมอักเสบ ขับลม กินมากเป็นยาขับพยาธิได้ ส่วนในใบเม็กมีฤทธิ์ทางยา คือ สามารถใช้เป็นยาขับเสมหะ แก้หลอดลมอักเสบ ขับลม หากรับประทานในปริมาณมาก สามารถใช้เป็นยาขับพยาธิได้ (ลลิตา ธีระสิริ, 2543) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเม็กมีศักยภาพในการป้องกันการทำงานที่ผิดปกติของหลอดเลือดได้ดี (vascular dysfunction) กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ได้ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของผักชนิดนี้ โดยให้รายละเอียดว่า เสม็ดแดง 100 กรัม ให้คาร์โบไฮเดรต 12.6 กรัม โปรตีน 3 กรัม ฟอสฟอรัส 27 มิลลิกรัม ธาตุเหล็ก 11.6 มิลลิกรัม และแคลเซียม 10 มิลลิกรัม ซึ่งพบว่าสูงมาก ขณะที่ได้เบต้าแคโรทีน 1415 ไมโครกรัม และวิตามินเอ 236 ไมโครกรัม วิตามินซี 16 มิลลิกรัม จัดได้ว่าผักเม็กเป็นผักที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมากชนิดหนึ่ง ส่วนที่พึงระวังสำหรับการรับประทานผักชนิดนี้ คือ ในเสม็ดแดงมีสารออกซาเลต (oxalate) สูง หากรับประทานสดหรือรับประทานจำนวนมากอาจเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วได้ ซึ่งแก้ไขโดยการรับประทานอาหารที่มีโปรตีนหรืออาหารประเภทเนื้อสัตว์ควบคู่กันไป

Maisuthisakul และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารต่างๆ คือ ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต พลังงาน ใยอาหาร แคลเซียม เหล็ก และวิตามินซีของใบเสม็ดแดงโดยวิธี partial least square (PLS) regression analysis และprincipal component analysis (PCA) และใช้วิธี DPPH วิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากงานวิจัยชิ้นนี้ทำให้ทราบว่ามีปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ 79.6% (1.2% Yield) ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม เม็ก 57.3 mg GAE/g db ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 23.6 mg RE/g db (db คือ dry weight basis)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของจิรัญญา บุรีมาศ (2550) ที่ศึกษาความเป็นไปได้ของการดื่มน้ำผักเม็กในอาสาสมัครผู้ใหญ่สุขภาพปกติ และผู้ป่วยเด็กธาลัสซีเมีย ในแง่ของความปลอดภัยและประสิทธิภาพเบื้องต้น อาสาสมัครทั้งหมดดื่มน้ำผักเม็กในขนาดที่ให้ชงดื่มคือ 0.1 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน แต่ไม่เกินวันละ 5 กรัม แบ่งชงดื่มวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือด ก่อนและหลังการศึกษา เพื่อประเมินความปลอดภัยและผลต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยวัดตัวแปรต่างๆ จากการศึกษาพบว่า การดื่มน้ำผักเม็กระยะสั้นมีความปลอดภัย และไม่มีความผิดปกติจากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งการตรวจ complete blood count, liver and kidney function tests ในอาสาสมัครสุขภาพปกติการดื่มน้ำเม็กสามารถเพิ่มระดับของ total antioxidant capacity พลาสมาจาก 678.3 ± 51.2 μM เป็น 887.4 ± 63.0 μM ระดับของ glutathione (GSH) รวมทั้งหมดหลังการดื่มน้ำผักเม็ก (928.6 ± 53.1 μM) มีค่าสูงกว่าก่อนการดื่มน้ำผักเม็ก (753.0 ± 50.4 μM) อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับระดับของ reduced GSH หลังการดื่มน้ำผักเม็กยังมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (912.2 ± 52.9 μM และ 741.8 ± 49.9 μM ตามลำดับ) การดื่มน้ำผักเม็กยังสามารถลดการสร้าง superoxide anion ที่ถูกกระตุ้นด้วย NADPH จาก 2254.0 ± 1118.8 เป็น 603.3 ± 101.5 relative light unit/sec ส่วนระดับของ malondialdehyde (MDA), protein carbonyl, การทำงานของเอนไซม์ γ-glutamylcysteine ligase (GCL) และการตอบสนองของหลอดเลือดจากการวัด forearm blood flow ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากดื่มน้ำผักเม็ก ในขณะที่การศึกษาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียพบว่าระดับของ total antioxidant capacity ในพลาสมาเท่ากับ 1056.4 ± 52.7 μEq และหลังการดื่มน้ำผักเม็กมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 1215.2 ± 62.5 μEq นอกจากนี้ระดับของ nitrite หลังการดื่มน้ำผักเม็ก (0.56 ± 0.08 μM) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับก่อนดื่ม (1.1 ± 0.09 μM) ระดับของ MDA ในพลาสมามีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2.0 ± 0.1 μM เป็น 2.6 ± 0.1 μM อย่างไรก็ตามพบว่า ระดับของ protein carbonyl, superoxide, nitrite oxide metabolites, การทำงานของเอนไซม์ GCL และการตอบสนองหลอดเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากดื่มน้ำผักเม็ก การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การดื่มน้ำผักเม็กระยะสั้นมีความปลอดภัยและสามารถเพิ่ม antioxidant ในพลาสมาได้

ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเพื่อให้เข้าใจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันของพืชสมุนไพรไทยชนิดนี้เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานอันจะเป็นจุดเริ่มต้นที่จะนำไปสู่การบริโภคด้วยความเชื่อมั่นและปรับปรุงผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของพืชที่มีอยู่แล้วในประเทศให้ยั่งยืนต่อไป

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เป็นสิ่งที่สำคัญหากแต่การศึกษาหาสิ่งที่จะนำมารักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคโดยเฉพาะสารที่ได้รับจากธรรมชาตินั้นน่าจะยิ่งมีความสำคัญมากกว่าภายใต้ภาวะของอุบัติการณ์ของโรคร้ายต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเรื้อรังอันเกิดจากความไม่สมดุลของสารต่างๆ ภายในร่างกาย รูปแบบการดำรงชีวิตที่เปลี่ยนไป รูปแบบการบริโภคอาหารที่ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเหล่านี้แทบทั้งสิ้น

จากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาพบว่า สารอาหารที่ได้รับความสนใจมากที่สุดและเป็นที่ยอมรับว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง คือ ไขมัน ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง ไขมันไม่เพียงแต่จะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญแก่ร่างกายเท่านั้น แต่ยังรวมอยู่เป็นองค์ประกอบในเมมเบรน และทำหน้าที่ควบคุมของเหลวในเมมเบรน ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เป็นกระบวนการที่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและฟอสโฟลิพิดเกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียสภาพจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์ขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์หรือ ลิพิดในเลือด และในของเหลวในร่างกายอื่นๆ เป็นต้น อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นความเสียหายจะไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้น แต่จะขยายวงกว้างไปยังองค์ประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์ การอักเสบ อันจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคความเสื่อมต่างๆ ตามมา เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Atherosclerosis) โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคต้อกระจก เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาหาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรที่จะมีผลต่อการลดความเสี่ยงอันอาจจะเกิดขึ้นจากไขมันจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจากกระบวนการที่จะนำมาอธิบายให้ชัดเจนนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด มีเพียงสมมติฐานที่ตั้งขึ้นมาเป็นแนวทางเพื่อรอการพิสูจน์ต่อไป

นอกจากลิพิดเปอร์ออกซิเดชันแล้ว ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะทำการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมันภายในเซลล์ โดยเฉพาะความเสียหายที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลขอลงกรดนิวคลีอิก จะสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังเซลล์ที่เกิดใหม่ บางครั้งอาจแสดงออกมาให้เห็นที่รูปร่างของสิ่งมีชีวิต หรืออาจเปลี่ยนแปลงจนถึงขั้นกลายเป็นมะเร็งในที่สุด ดังนั้นการค้นหาสารที่จะมายับยั้งอนุมูลอิสระต่างๆ รวมถึงกลไกการต่อต้าน

กระบวนการดังกล่าวจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่น่าสนใจสำหรับการหยุดยั้งการพัฒนาไปเป็นมะเร็งรวมทั้งโรคเรื้อรังอื่นๆ อันเป็นสาเหตุการตายลำดับต้นๆ ในปัจจุบัน

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชทานพระราชดำริให้สำนักงานมูลนิธิชัยพัฒนาดำเนินการรับโอนที่ดินซึ่งครอบครัวลักคุณะประสิทธิ์ขอพระราชทานน้อมเกล้าฯ ถวายที่ดินจำนวน 14 แปลงเนื้อที่รวม 160 ไร่ 1 งาน 46 ตารางวา ตั้งอยู่ที่ตำบลตกพรม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรีเพื่อใช้ประโยชน์ในมูลนิธิชัยพัฒนาโดยได้ดำเนินการจัดทำโครงการพัฒนาป่าชุมชนให้ผู้สนใจเข้ามาศึกษาหาความรู้เพื่อการอนุรักษ์ และฟื้นฟูสภาพป่าไม้ รวมทั้งสนับสนุนให้ชุมชนมีความเข้าใจและรู้จักใช้ทรัพยากรธรรมชาติให้เกิดประโยชน์อย่างยั่งยืน

จากการศึกษาเก็บข้อมูลเบื้องต้นจากโครงการฯ ดังกล่าว พบว่าในพื้นที่ของโครงการฯ มีพืชสมุนไพรที่หลากหลายอยู่เป็นจำนวนมาก แต่มีปัญหาในเรื่องการขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มารองรับการนำไปใช้ จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาผลของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่ได้จากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลากหลายมิติ ซึ่งในเบื้องต้นผู้วิจัยพบว่า เสม็ดแดงเป็นพืชอีกชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเป้าการวิจัยไปที่พืชชนิดนี้เพื่อศึกษาในเชิงลึกถึงสารที่เป็นองค์ประกอบที่สามารถออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านอันเป็นการสนองแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และเพื่อลดการนำเข้ายาและอาหารเสริมสุขภาพจากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ ต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์จากส่วนสกัดย่อยของพืชสมุนไพร
2. เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดย่อยของพืชสมุนไพร
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของพืชสมุนไพร
4. ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำใบเสม็ดแดงจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรีมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากส่วนสกัด จากนั้นนำสารที่สกัดได้ทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นการ

ทำในหลอดทดลอง จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์และหาโครงสร้างทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกครั้ง

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

สมุนไพรไทยหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน เช่น รักษาผดผื่นคัน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ความดัน และโรคหัวใจรักษาอาการ ขัดเบาปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย ขับนิ่ว ขับปัสสาวะใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ไข้ขับเหงื่อ และแก้เบาหวานรักษาอาการเส้นตึงหรือนำมาทำเป็นขี้ผึ้งรักษาแผลเรื้อรัง ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล แก้อักเสบ แก้ริดสีดวงจมูก ขับนิ่วในทางเดินปัสสาวะใบและราก แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้แผลอักเสบ รากสดตำพอกบริเวณแผล (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) ถึงแม้ว่าจะเป็นที่ทราบกันดีในกลุ่มแพทย์แผนไทยว่าสมุนไพรไทยมีสรรพคุณต่างๆ มากมาย แต่หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีรายงานส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการลดน้ำตาล ลดความดัน และการขับปัสสาวะ แต่ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันยังมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งทำให้เกิดข้อกังขาได้ว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรพื้นบ้านเป็นประจำเพื่อใช้เป็นยาอายุวัฒนะจะมีผลต่อกระบวนการต่างๆ เหล่านี้หรือไม่ และในกรณีของผู้ป่วยโรคเรื้อรังหรือโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ สมุนไพรจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดกระบวนการดังกล่าวหรือไม่ นอกจากนี้ยังมีคำถามต่อไปว่าสารที่พบในสมุนไพรจะมีฤทธิ์ดังกล่าวหรือไม่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีซึ่งสารดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ในการก่อโรคร้ายอื่นๆ ได้เช่นกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยยังต้องการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของพืชสมุนไพรดังกล่าวด้วย ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าวซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้เพื่อเป็นหลักฐานสนับสนุนถึงความปลอดภัยและเห็นคุณค่าของการใช้สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานและส่งเสริมคุณค่าของผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นสินค้าเพื่อสุขภาพในลำดับต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรจะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของพืชสมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้จากพืชสมุนไพร และนำข้อมูลที่ได้จดองค์ความรู้ที่ได้ในรูปสิทธิบัตรได้ ทำให้องค์ความรู้นี้เป็นของประเทศไทย และยังสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยไปเป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยาชนิดใหม่ได้

1.6.2 บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของส่วนสกัดย่อยจากพืชสมุนไพร จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของสมุนไพรเพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกและอนุรักษ์พืชสมุนไพรมากขึ้น โดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่นรายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ รวมทั้งข้อมูลที่ได้จะถูกนำเผยแพร่โดยโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

1.6.3 บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

สมุนไพรต่างๆ อาจเป็นพืชที่มีศักยภาพต่อการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ เพราะมีการเจริญเติบโตได้เร็วเมื่อมีการเก็บเกี่ยว ขึ้นได้ทั่วไปในเขตป่าภาคตะวันออกและใกล้เคียง ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จะเป็นสิ่งยืนยันของประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรในการนำมาใช้เป็นชา หรือเป็นสมุนไพรในเครื่องสำอาง ส่งเสริมการขายให้กลุ่มวิสาหกิจชุมชน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์มากขึ้น และผู้ผลิตสามารถขยายตลาดออกไปสู่วงกว้างมากขึ้น รวมทั้งการนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ทำยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างอื่นได้อีก

นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ของส่วนสกัดจากสมุนไพรที่แยกได้อาจเป็นสารชนิดใหม่และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารแอนติออกซิแดนท์เดิมในอุตสาหกรรมอาหารและยาหลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทยา เป็นต้น เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.6.4 เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมและโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระกันมาก จะสามารถได้ใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จำนวนไม่น้อยกว่า 1 คน และเป็นโครงงานวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรีประมาณ 1 โครงงาน

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยาและชุมชน และประชาชนมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับการใช้สมุนไพรต่างๆ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ชุดเครื่องแก้วและเครื่องมือมาตรฐาน

1. Air oven incubator (Bindea, Germany)
2. Autopipette (Gilson, France)
3. Blender (Electrolux, China)
4. Chromatography paper number 1 (Whatman, UK)
5. Flask evaporating pear shape (Schott, Germany)
6. Freeze-dryer (GAST, USA)
7. Microplate reader (Versa max, USA)
8. Nuclear magnetic resonance spectrometer 400 MHz (NMR) (Bruker, Germany)
9. Rotary evaporator (EYELA, Japan)
10. Separating funnel (Witeg, Germany)
11. Vacuum pump (GAST Mfg., USA)
12. 96 well microplate (Costar, USA)
13. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 713 pH Meter (Metrohm, ประเทศสาธารณรัฐฝรั่งเศส)
14. เครื่อง NMR รุ่น AVANCE 400 ยี่ห้อ BRUKER ความถี่ 400 MHz

2.1.2 สารเคมี

1. Ascorbic acid (APS, Australia)
2. Deuterated chloroform ($CDCl_3$) (Merck, Germany)
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany)
4. Dimethyl sulfoxide-d_6 (DMSO-d_6) (Merck, Germany)
5. Distilled water
6. Ethanol (Merck, Germany)
7. Ethyl acetate (Merck, Germany)

8. Hexane (Honey Well B&J, USA)

9. Methanol (Honey Well B&J, USA)

10. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Germany)

11. Acetic acid (Carlo erba, Germany)

12. Ethylene-dinitrilotetraacetic acid (EDTA) (Merck, Germany)

13. Ferrous sulphate (Lobachemie, India)

14. Ferrozine (Sigma, Germany)

15. Folin-Ciocalteu's reagent (Carlo erba, Germany)

16. Hydrochloric acid (Merck, Germany)

17. Iron (III) Chloride hexahydrate (MERCK, Germany)

18. Silica gel size 0.040-0.063 mm. (Merck, Germany)

19. Sodium carbonate (Carlo erba, Germany)

20. 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Sigma, Germany)

21. TLC silica gel 60 F_{254} aluminium sheet 20×20 cm. (Merck, Germany)

22. Chloroform-d, $CDCl_3$

23. Deuterium oxide, D_2O

24. Methanol-d4, CD_3OD

25. Dimethyl Sulfoxide-d6, DMSO, $(CD_3)_2SO$

26. Acetone-d6

2.2 พืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

จากการศึกษาที่ผ่านมา ผู้วิจัยพบว่า สารสกัดจากใบเสม็ดแดง (*Syzygium gratum* (Wight) S.N. Mitra var. gratum) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Lecythidaceae มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ การทำวิจัยนี้จึงได้เลือกเอาเฉพาะใบเสม็ดแดงซึ่งเก็บมาจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี มาทำการศึกษาต่อยอดเพื่อนำส่วนสกัดย่อยไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์และหาโครงสร้างทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกครั้ง

2.3 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำใบเสม็ดแดงมาล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และปั่นให้ละเอียด แบ่งพืชมาสกัดแบบ maceration ด้วยเอทานอลในอัตราส่วน

1:10 เป็นเวลา 5 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แยกส่วนกากและส่วนเอทานอล ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ส่วนสกัดเอทานอลถูกนำไปแยกด้วยน้ำแล้วแยกต่อ (partition) ด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทโดยใช้กรวยแยก แต่ละชั้นถูกนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ นำแต่ละส่วนไปชั่งเพื่อคำนวณ %yield นำสารที่ได้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

2.4 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ดัดแปลงจากวิธีของปรียานุช อินทร์รอด (2551) โดยทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) โดยเตรียมกรดแกลลิก (gallic acid) ละลายในเมทานอล แล้วนำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยเริ่มจากปิเปตน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) หรือส่วนสกัดพืช ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Folin-Ciocalteu 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย 7% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายลงในไมโครเพลท ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท แสดงปริมาณสารฟีนอลรวมจากสมการกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) โดยมีสมการเส้นตรง คือ y = 1.760+0.146 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.990 แสดงปริมาณฟีนอลรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดพืช ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.5 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH

ดัดแปลงจากวิธีของปรียานุช อินทร์รอด (2551) โดยเตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารสกัดพืชที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดพืช 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) และบีเอชที (butylated hydroxytoluene) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอ้างอิง ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH} = A_a - (A_b - A_c)/A_a \times 100$$

โดยที่ A_a คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ประกอบด้วยเมทานอลและสารละลาย DPPH

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ประกอบด้วยตัวอย่างและสารละลาย DPPH

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยตัวอย่างและเมทานอล

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

จากนั้นวิเคราะห์หาค่า EC_{50} โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของพืชแต่ละชนิด ดังนี้ คำนวณค่า EC_{50} ของใบเสม็ดแดงจากสมการเส้นตรง y = 0.863x+13.90 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.904

2.6 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์

ดัดแปลงจากวิธีของ Rao et al. (2010) สร้างกราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก โดยละลายกรดแกลลิกในเมทานอล จากนั้นทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยเริ่มจากปิเปตสารละลายกรดแกลลิก หรือสารสกัดพืช ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, pH 6.6) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ 1% โพแทสเซียมเฟอร์ลิกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 10% กรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บสารละลายส่วนบนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก โดยมีสมการเส้นตรง คือ y = 7.616x + 0.069 มีค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.999 แสดงความสามารถในการรีดิวซ์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดพืช ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.7 การศึกษาคุณลักษณะทางเคมีขององค์ประกอบในสารสกัด

นำส่วนสกัดย่อยไปทำการแยก fraction โดยการทำ column chromatography จากนั้นนำไปศึกษาโครงสร้างและคุณลักษณะทางเคมี (elucidation) โดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy, Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS) และ Scanning Electron Miscroscopy (SEM)

2.7.1 การคัดเลือกระบบตัวทำละลาย

สารละลายต่างๆ ถูกนำมาใช้สำหรับการชะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาแบบ isocratic elution ตามวิธีของ Claeson (1993) ซึ่งการคัดเลือกระบบของตัวทำละลายทำโดยนำไปรันบนโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography; TLC) ตัวทำละลายที่นำมาใช้ โดยปกติจะมีความมีขั้วที่แตกต่างกัน เช่น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเธน หรืออะซิโตน สำหรับสารที่มีขั้วน้อย ส่วนเมทานอลในคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเธนหรือเอทิลอะซิเตท จะใช้สำหรับสารที่มีขั้วมากกว่า

2.7.2 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบเสม็ดแดงโดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

dry filling method เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้สำหรับการบรรจุซิลิกาเจลในคอลัมน์ ซิลิกาเจลถูกบรรจุลงในคอลัมน์ตามแรงดึงดูดเพื่อที่จะทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งระหว่างการบรรจุไม่ควรคนหรือกวนและควรทิ้งไว้ข้ามคืน ผสมสารสกัดกับซิลิกาเจลในอัตราส่วน 1:1.5 (ปริมาตร/ปริมาตร สารสกัด:ซิลิกาเจล). จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ สารตัวอย่างจะถูกโหลดจากด้านบนของคอลัมน์ หลังจากนั้นจะทำการชะสารออกมาจากคอลัมน์ด้วยการปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย

2.7.3 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง

แฟรกชันต่างๆ จากโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ถูกแต้มด้วยหลอดแคปิลารีลงบนแผ่น TLC (silica gel 60 F_{254} aluminium sheet) แล้วนำไปวางบนภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายที่เหมาะสมจนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาจนถึง front line จากนั้นทำการตรวจสอบอแล้วทำการเก็บแฟรกชันที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นมากขึ้นด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย

2.7.4 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น TLC

แต่ละแฟรกชันถูกวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH โดยการพ่นสารละลาย DPPH บนแผ่น TLC ก่อนนำไปส่องใต้แสงยูวี

2.7.5 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR)

สเปกตรัมของ NMR ถูกหาด้วยเครื่อง AVANCE 400 NMR spectrometer (400 MHz) โดยใช้ TMS เป็น internal standard นำแฟรกชันต่างๆ ที่ได้จากการทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์มาละลายด้วย $CDCl_3$ หรือ DMSO-d_6 ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย NMR spectroscopy.

2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกตัวอย่างในแต่ละการวิเคราะห์ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เป็นจำนวนอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD) การวิเคราะห์ความแตกต่างของสารต้านอนุมูลอิสระใช้การทดสอบ One-way ANOVA และ Duncan's multiple range tests เมื่อกำหนดความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 18

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากพืช

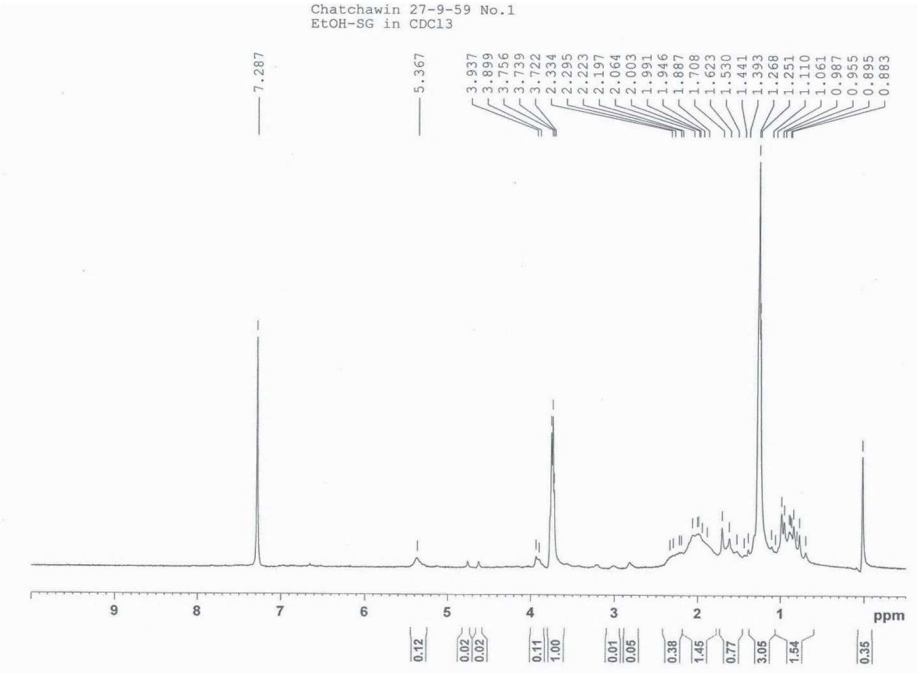
จากการนำใบเสม็ดแดงที่อบแห้งแล้วมา 800 กรัม สกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:10 และนำไประเหยแห้ง โดยจะได้น้ำหนักสารสกัด และคำนวณ %yield ได้ตามตารางที่ 3-1 โดยใบเสม็ดแดงได้น้ำหนักสารสกัดเอทานอล และมี %yield คือ 118.20 กรัม และ 14.75% ตามลำดับ จากนั้นนำมาแยกเป็นส่วนสกัดย่อยตามความมีขั้วของตัวทำละลายโดยแบ่งเป็น ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ ซึ่งมีน้ำหนักของสารสกัดเท่ากับ 7.45, 17.79 และ 29.78 กรัม ตามลำดับ คิดเป็น %yield เท่ากับ 6.41, 15.31 และ 25.63% ตามลำดับ

ตารางที่ 3-1 ปริมาณสารสกัดเอทานอลและส่วนสกัดย่อยต่างๆ และ %yield จากแต่ละส่วนสกัดของใบเสม็ดแดง

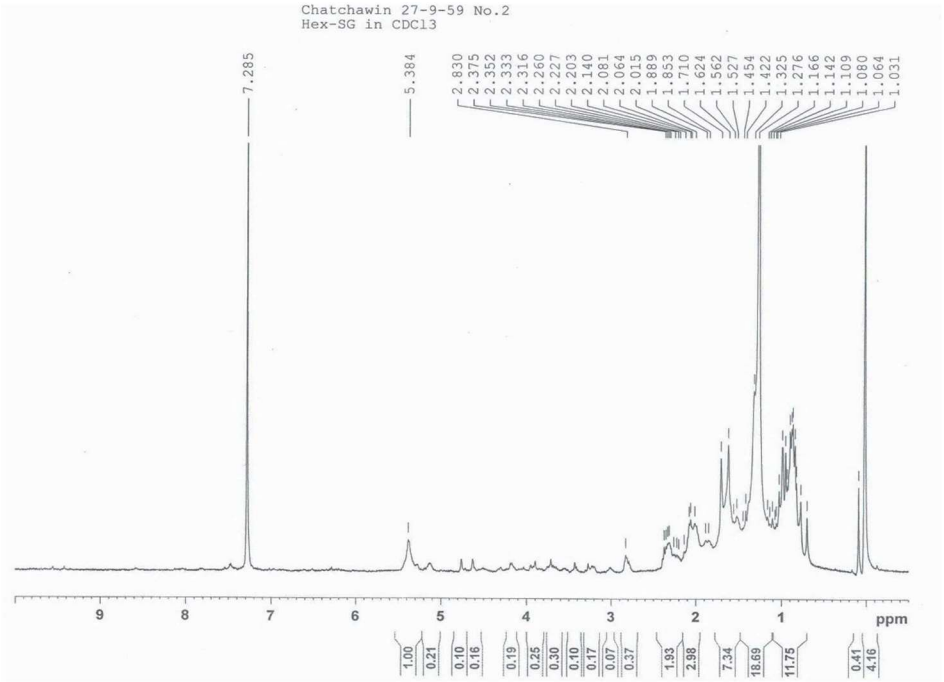
ส่วนสกัด / ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักพืชสด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	%yield
เอทานอล	800	118.203	14.75
เฮกเซน	-	7.45	6.41
เอทิลอะซิเตท	-	17.79	15.31
น้ำ	-	29.78	25.63

3.2 การทดสอบส่วนสกัดย่อย

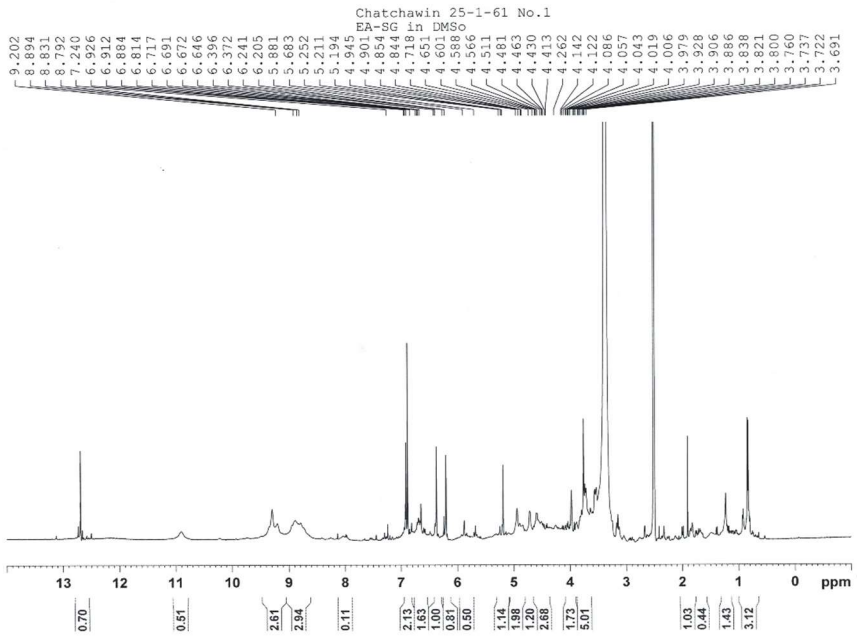
สารสกัดเอทานอลและส่วนสกัดย่อยต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ถูกนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy นำส่วนสกัดเอทานอล และเฮกเซนมาละลายใน $CDCl_3$ ส่วนเอทิลอะซิเตท และส่วนน้ำนำมาละลายใน DMSO-d_6 จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วย NMR spectroscopy สเปกตรัม ^{1}H NMR แสดงไว้ในรูปที่ 3-1 ถึง 3-4 จากนั้นนำไปทดสอบหาปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP



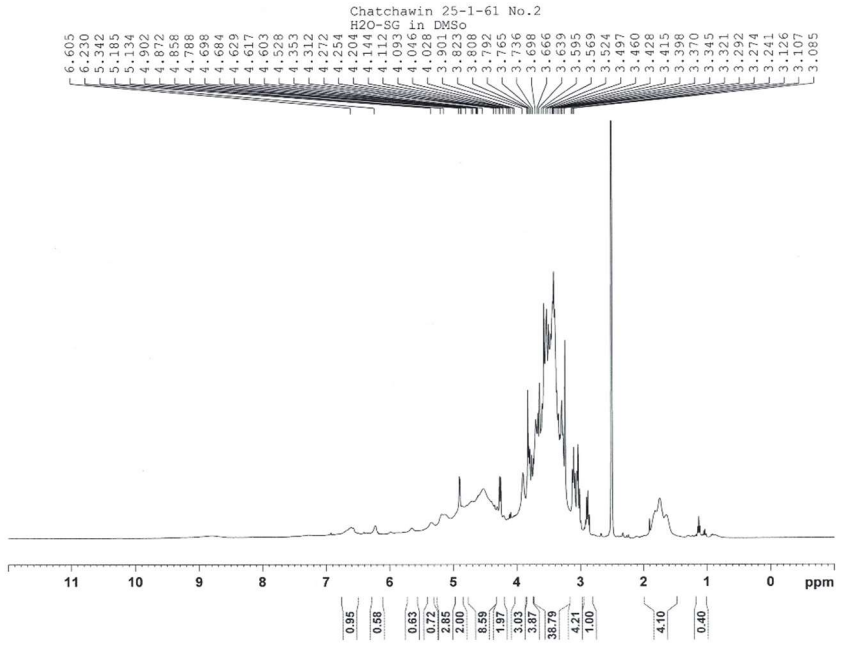
รูปที่ 3-1 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดเอทานอลจากใบเสม็ดแดง



รูปที่ 3-2 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดย่อยเฮกเซนจากใบเสม็ดแดง



รูปที่ 3-3 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบเสม็ดแดง

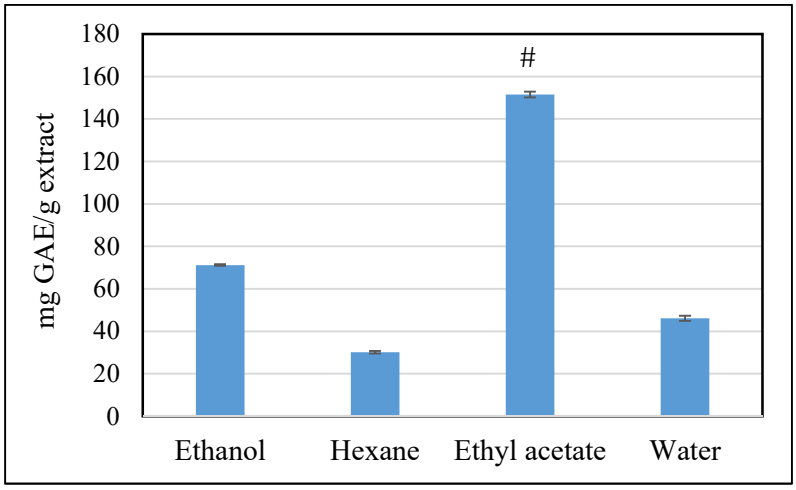


รูปที่ 3-3 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารสกัดย่อยน้ำจากใบเสม็ดแดง

3.2.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของใบเสม็ดแดง (รูปที่ 3-5) โดยใช้ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบเสม็ดแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดเท่ากับ 151.458±1.360 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด รองลงมา คือ ส่วนสกัดหยาบเอ

ทานอล ส่วนสกัดย่อยน้ำ และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 71.195 46.115 และ 30.117 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ



รูปที่ 3-5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดใบเสม็ดแดงที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ, # แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากใบเสม็ดแดงโดยนำสารสกัดใบเสม็ดแดงมา เจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดใบเสม็ดแดงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ทั้งนี้พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (0.1-3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดจากใบเสม็ดแดงมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ค่อนข้างน้อย ยกเว้นส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้เกือบ 50% (49.62%) ส่วนสกัดที่เหลือสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้เพียง 11-24% เท่านั้น แต่อย่างไรก็ยังมีฤทธิ์นี้ไม่ดีเท่ากับวิตามินซีที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ส่วนค่า EC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดใบเสม็ดแดง (ตารางที่ 3-2) พบว่า ส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และน้ำของใบเสม็ดแดงมีค่า EC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ 0.143 0.667 0.071 และ 0.164 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ค่า EC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารละลายวิตามินซี เท่ากับ 0.022 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3-2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนสกัดต่างๆ ของใบเสม็ดแดง และค่า EC_{50} ของการกำจัดอนุมูล

ส่วนสกัด/ส่วนสกัดย่อย	% DPPH radical scavenging	EC_{50} (mg/mL)
Ethanol	21.1	$0.143 \pm 0.002^{b,c}$
Hexane	11.44	0.667 ± 0.062^{a}
Ethyl acetate	49.62	$0.071 \pm 0.002^{c,d}$
Water	24.02	0.164 ± 0.011^{b}
Ascorbic acid	95.09	0.022 ± 0.001^{d}

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b,c,d] ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3.2.3 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์

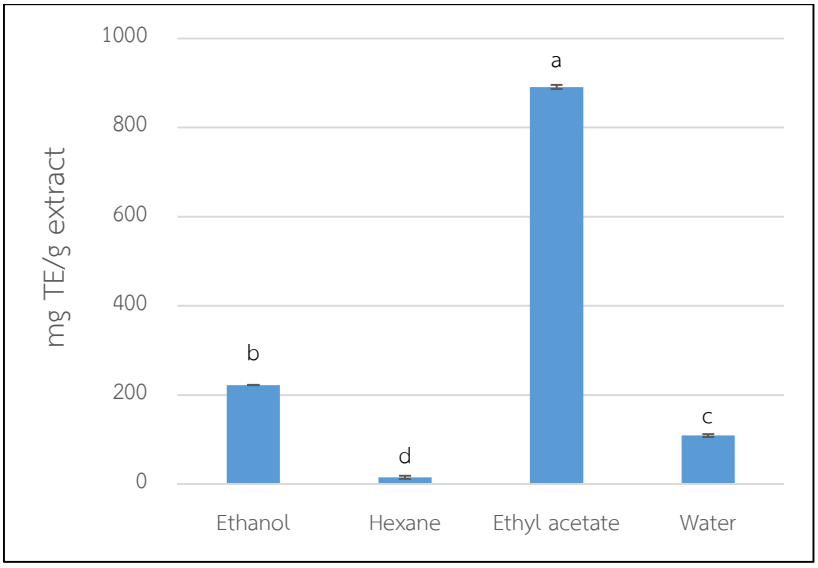
การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารสกัดใบเสม็ดแดง โดยเลือกความเข้มข้นที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3-3 และรูปที่ 3-6) พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีค่า FRAP มากที่สุดเท่ากับ 890.885 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์/สารสกัด 1 กรัม แสดงว่ามีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบเอทานอล (222.414 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์/สารสกัด 1 กรัม) ส่วนสกัดย่อยน้ำ (109.128 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์/สารสกัด 1 กรัม) และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (15.12 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์/สารสกัด 1 กรัม) ตามลำดับ

ตารางที่ 3-3 ค่า FRAP ของส่วนสกัดต่างๆ จากใบเสม็ดแดงที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ส่วนสกัด/ส่วนสกัดย่อย	FRAP value (mg TE/g extract)
Ethanol	222.414 ± 0.370^{b}
Hexane	15.12 ± 3.732^{d}
Ethyl acetate	890.885 ± 4.724^{a}
Water	109.128 ± 3.433^{c}

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

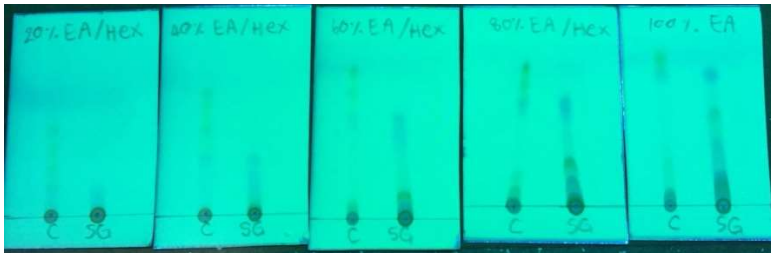
[a,b,c,d] ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



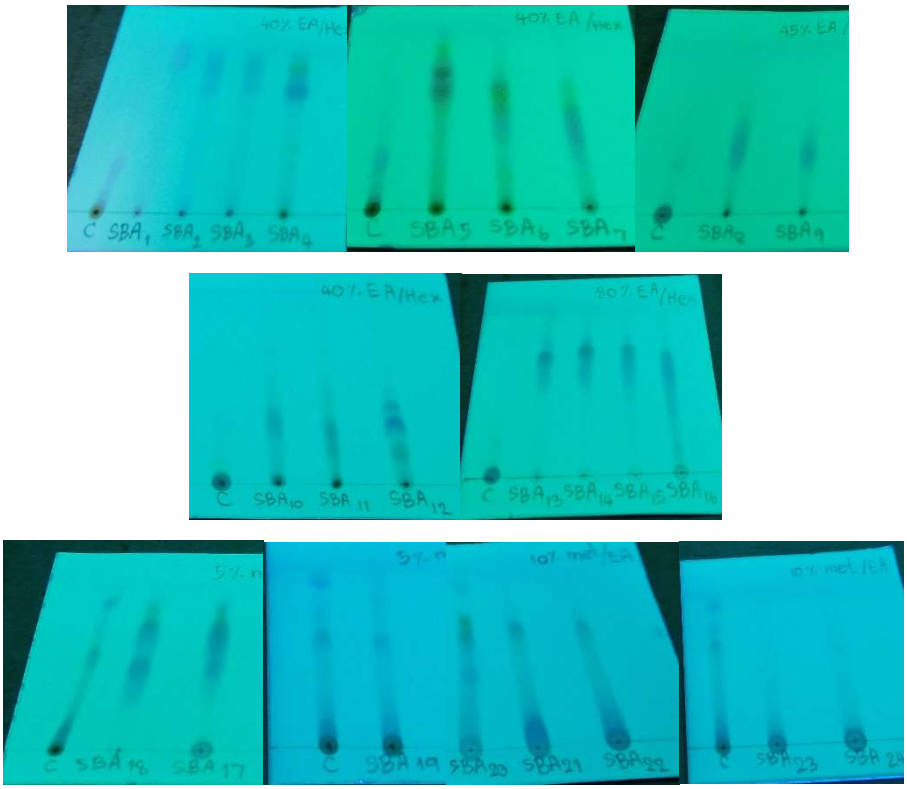
รูปที่ 3-6 ค่า FRAP ของส่วนสกัดต่างๆ จากใบเสม็ดแดงที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.3 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

จากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดทั้งในการทดสอบด้วย DPPH และ FRAP ดังนั้น จึงเลือกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ รูปที่ 3-7 แสดงถึงการวิเคราะห์ด้วย TLC ของแฟรกชัน FBA7 หลังจากผ่านออกมาจากคอลัมน์ ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารคือเอทิลอะซิเตทผสมกับเฮกเซน นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท 15 กรัมผสมซิลิกาเจลในอัตราส่วน 1:1.5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ด้วยวิธี dried packing คอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร) ถูกบรรจุด้วยซิลิกาเจล 9385 (ขนาดรูพรุน 0.040-0.063 มิลลิเมตร) ทำการเก็บแฟรกชันต่างๆ และตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี TLC สารต้านอนุมูลอิสระถูกวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยการพ่น DPPH ลงไปบนแผ่น TLC ซิลิกาเจลที่ถูกบดแล้วถูกบรรจุลงในคอลัมน์ ชะด้วยระบบตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เอทิลอะซิเตทผสมกับเฮกเซน และ เมทานอลผสมกับเอทิลอะซิเตท ถูกทำให้เข้มข้นมากขึ้นด้วย vacuum rotary evaporator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก แฟรกชันย่อยที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 1 ถูกเก็บและตรวจสอบด้วย TLC (รูปที่ 3-8) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยการพ่น DPPH ลงไปบนแผ่น TLC น้ำหนักแห้งและ %yield แสดงไว้ในตารางที่ 3-4 ซึ่งจะเห็นได้ว่า แฟรกชัน FSG6 มีน้ำหนักมากที่สุด (5.152 กรัม and 34.347% yield)



รูปที่ 3-7 TLC ของแฟรกชันเอทิลอะซิเตทจากใบเสม็ดแดง



รูปที่ 3-8 TLC ของแฟรกชันต่างๆ หลังจากผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 1 เมื่อ แฟรกชัน FBA1 ถูกรวมโดยใช้ SBA1-4, แฟรกชัน FBA2 ถูกรวมโดยใช้ SBA5, แฟรกชัน FBA3 ถูกรวมโดยใช้ SBA6-7, แฟรกชัน FBA4 ถูกรวมโดยใช้ SBA8-10, แฟรกชัน FBA5 ถูกรวมโดยใช้ SBA11-16, แฟรกชัน FBA6 ถูกรวมโดยใช้ SBA17-20, แฟรกชัน FBA7 ถูกรวมโดยใช้ SBA21-22 และ แฟรกชัน FBA8 ถูกรวมโดยใช้ SBA23-24

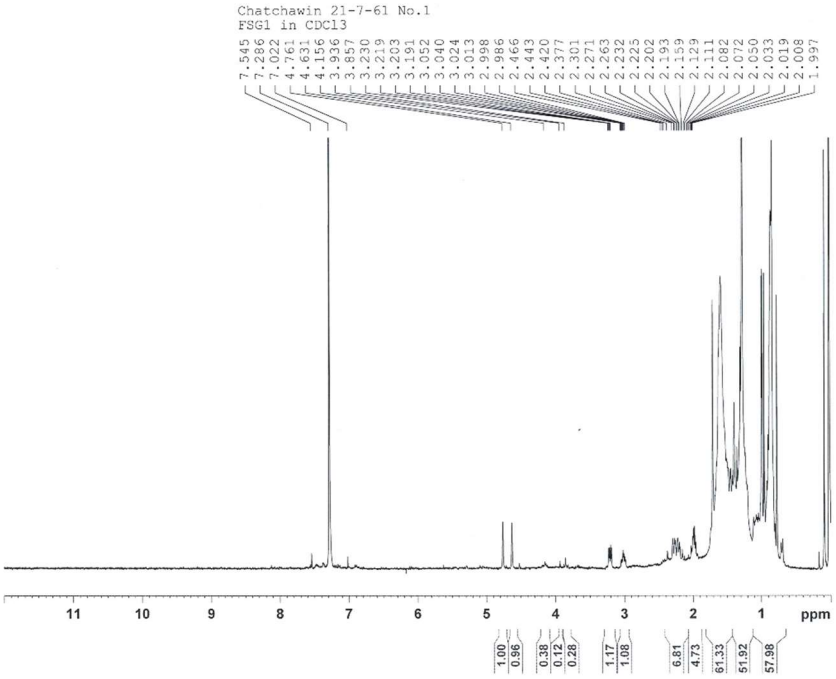
ตารางที่ 3-4 น้ำนักแห้งและ %yield ของแต่ละส่วนสกัดย่อยจากใบเสม็ดแดง ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

Fraction	Dry weight (g)	% yield
FSG1	0.0883	0.5886
FSG2	0.1242	0.828

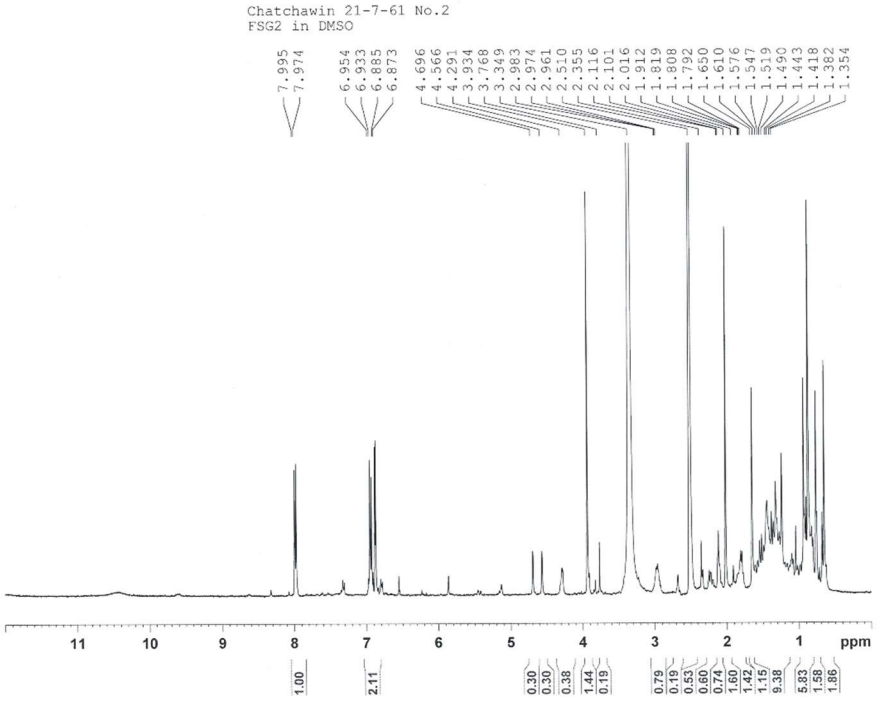
Fraction	Dry weight (g)	% yield
FSG3	0.1018	0.6787
FSG4	0.239	1.5933
FSG5	0.175	1.1667
FSG6	5.152	34.3467
FSG7	3.0606	20.404
FSG8	2.052	13.68

3.4 การศึกษาโครงสร้างของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในส่วนสกัดย่อย

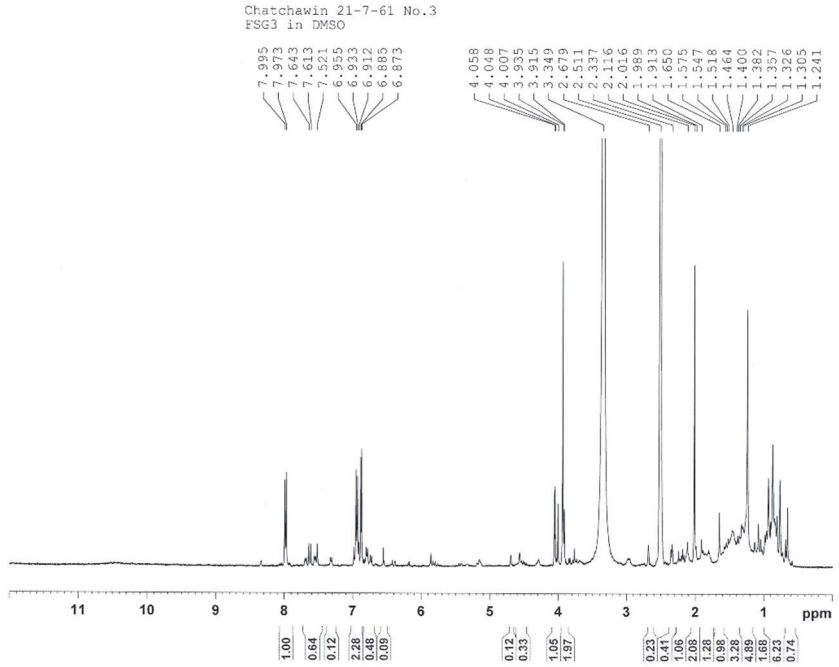
หลังจากนั้น ทุกแฟรกชันที่ได้มาจากคอลัมน์แรกจะถูกนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR spectroscopy โดยแฟรกชัน FSG1 ถูกนำมาละลายใน $CDCl_3$ ขณะที่แฟรกชัน FSG2 ถึง FSG8 จะถุกนำมาละลายด้วย DMSO-d_6 จากนั้นศึกษาสเปกตรัม ^{1}H NMR ของทุกแฟรกชัน ดังแสดงในรูปที่ 3-9 ถึง 3-16



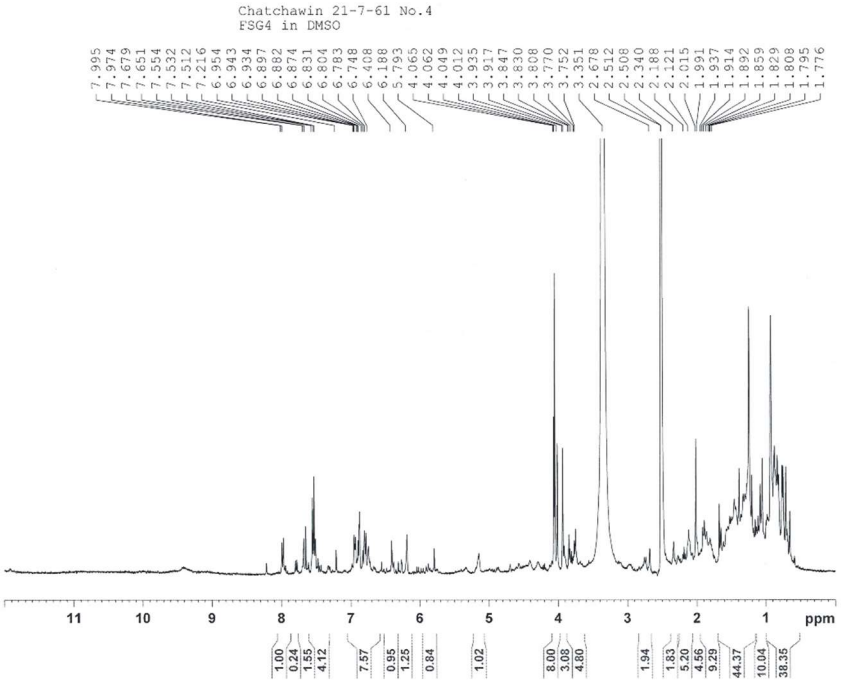
รูปที่ 3-9 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG1 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



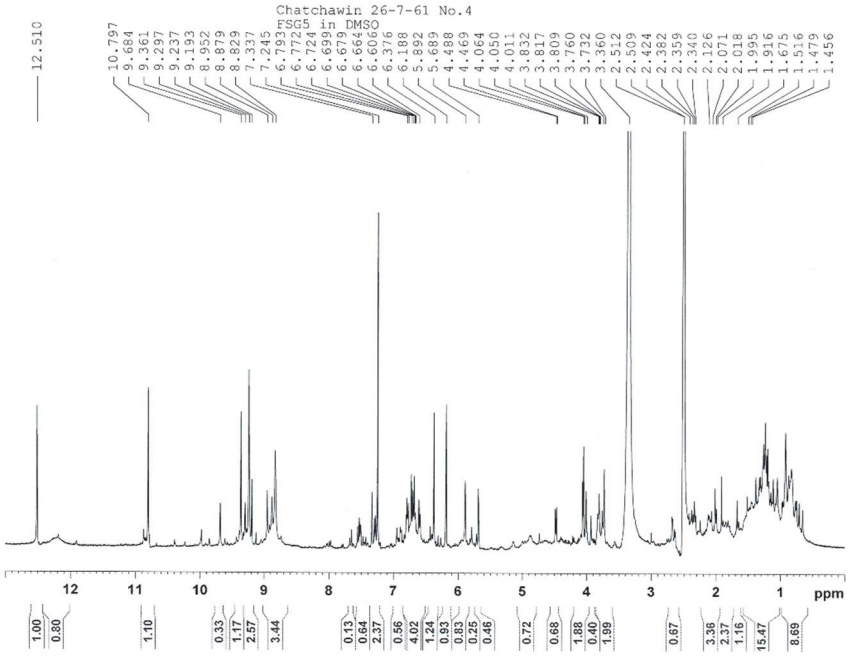
รูปที่ 3-10 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG2 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



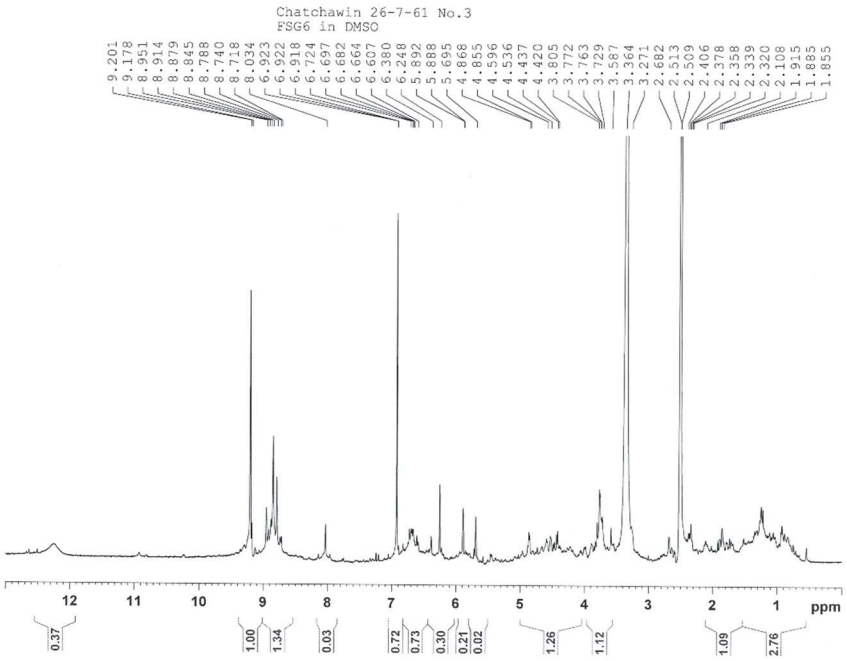
รูปที่ 3-11 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG3 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



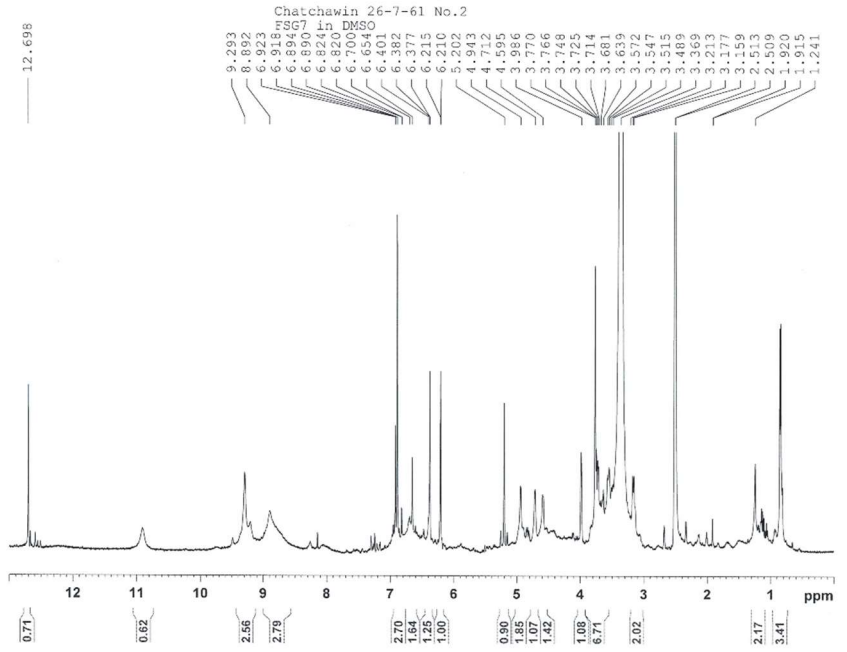
รูปที่ 3-12 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG4 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



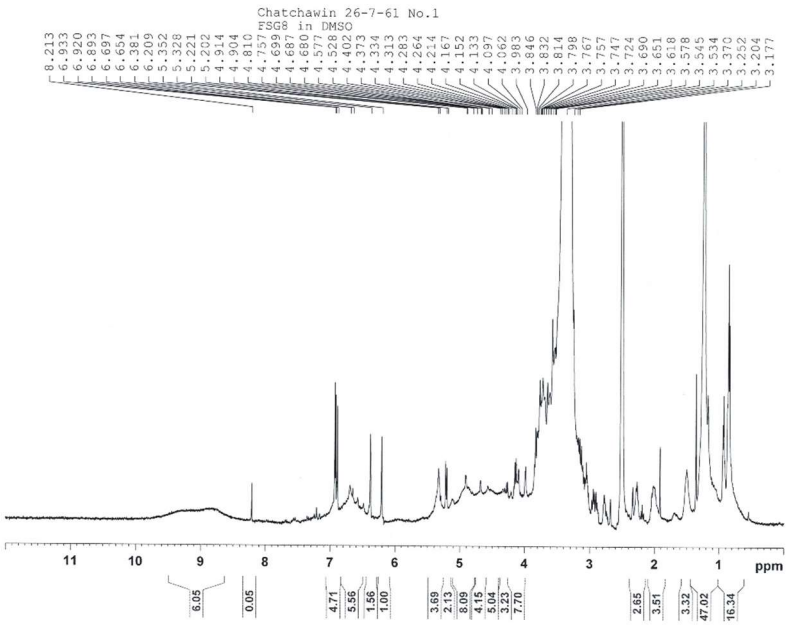
รูปที่ 3-13 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG5 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



รูปที่ 3-14 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG6 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



รูปที่ 3-15 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG7 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



รูปที่ 3-16 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของแฟรกชัน FSG8 หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

3.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแฟรกชันต่างๆ หลังจากผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

3.5.1 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH

ในตารางที่ 3-5 แสดงเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของแฟรกชันย่อยต่างๆ โดยแฟรกชัน FSG7 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุดถึง 94.36% ซึ่งใกล้เคียงกับกรดแอสคอร์บิกที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (96.46%) ตามมาด้วยแฟรกชัน FSG5 (91.68%), FSG8 (83.81%) และ FSG6 (82.94%) ตามลำดับ ส่วนแฟรกชัน FSG4 สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้เพียง 36% ในขณะที่แฟรกชัน FSG1 ถึง FSG3 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ค่อนข้างน้อย (<30%)

ตารางที่ 3-5 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของแต่ละแฟรกชันย่อย

Fraction	% DPPH radical scavenging
FSG1	4.44^{f}
FSG2	14.28^{e}
FSG3	12.94^{e}
FSG4	36.39^{d}
FSG5	91.68^{b}
FSG6	82.94^{c}

Fraction	% DPPH radical scavenging
FSG7	94.36[a]
FSG8	83.81[c]
Ascorbic acid	96.46[a]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a,b,c,d] ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

3.5.2 **Ferric Reducing Antioxidant Power assay (FRAP)**

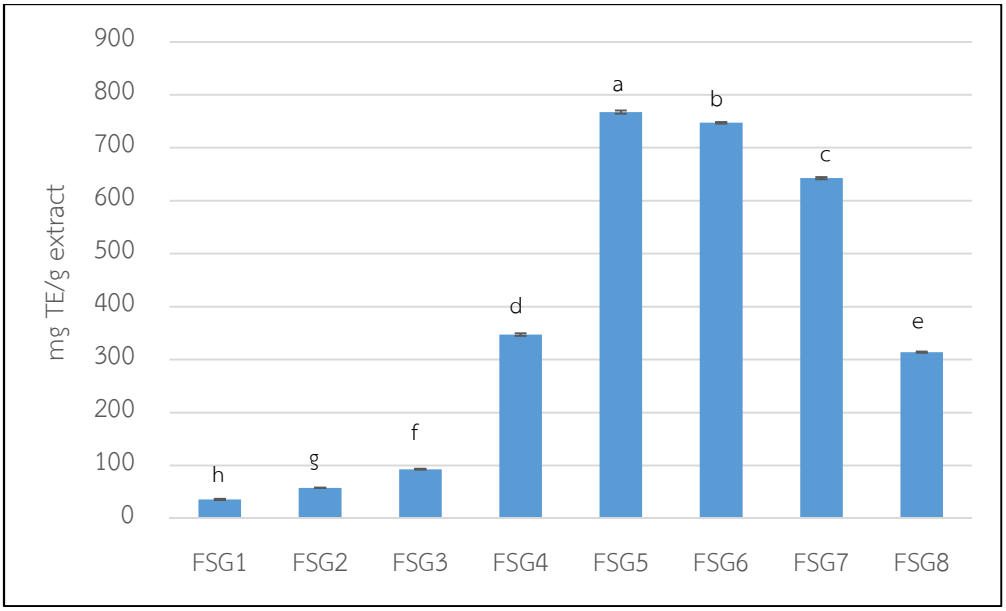
ผลการทดลองแสดงเป็นค่า FRAP ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน แฟรกชัน FSG5 และ FSG6 มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีที่สุด โดยมีค่า FRAP เท่ากับ 767.373 ± 3.272 และ 747.173 ± 1.425 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox (TE)/กรัมของส่วนสกัด ในขณะที่แฟรกชัน FSG7 และ FSG4 มีค่า FRAP เท่ากับ 642.604 ± 2.157 and 347.27 ± 2.192 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox (TE)/กรัมของส่วนสกัด ส่วนค่า FRAP ของแฟรกชัน FSG1-FSG3 มีค่าอยู่ระหว่าง 35.912 ± 1.421 ถึง 92.859 ± 0.872 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox (TE)/กรัมของส่วนสกัด (ตารางที่ 3-6 และรูปที่ 3-17)

ตารางที่ 3-6 ค่า FRAP ของแต่ละแฟรกชันย่อยที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Fraction	FRAP value (mg TE/g extract)
FSG1	35.912 ± 1.421[h]
FSG2	57.852 ± 0.198[g]
FSG3	92.859 ± 0.872[f]
FSG4	347.27 ± 2.192[d]
FSG5	767.373 ± 3.272[a]
FSG6	747.173 ± 1.425[b]
FSG7	642.604 ± 2.157[c]
FSG8	314.020 ± 1.175[e]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a-h] ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



รูปที่ 3-17 ค่า FRAP ของแต่ละแฟรกชันที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

$^{a-h}$ ตัวอักษรต่างกันที่อยู่เหนือแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทที่ 4

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

ปัจจุบัน การแพทย์แผนโบราณและแพทย์พื้นบ้านเริ่มกลับมามีบทบาทสำคัญในการดูแลสุขภาพและการรักษาโรคต่างๆ ทางภาคตะวันออกของประเทศไทยก็เช่นกัน เป็นแหล่งของพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด จากการศึกษาก่อนหน้าของเสม็ดแดงซึ่งทำการสกัดด้วยน้ำ แสดงให้เห็นถึงการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างดีทั้งในการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ความสามารถในการให้อิเล็กตรอน ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวม (Thepmongkon et al., 2013) ความสามารถในการคีเลทโลหะ ความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS (Kukongviriyapan et al., 2007; Petchlert et al., 2013) แม้ว่าใบของเสม็ดแดงจะมีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรและมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาพอสมควร แต่ก็ยังไม่การศึกษาใดที่ลงไปถึงระดับของสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบในใบของเสม็ดแดงเลย ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้ทำการทดสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยอาศัยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นตัวนำทางในการแยกสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบเสม็ดแดงที่ได้มาจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี โดยทำการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ใบเสม็ดแดงถูกสกัดด้วยเอทานอลก่อน จากนั้นจึงนำไปสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ทุกส่วนสกัดถูกนำไปศึกษาคุณลักษณะด้วย NMR spectroscopy ได้สปเกตรัม ^{1}H NMR ของทั้งสี่ส่วนสกัดดังรูปที่ 3-1 ถึง 3-4 จากนั้นจึงนำไปทดสอบหาปริมาณฟีนอลรวม พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด คือ 151.485 ± 1.360 มิลลิกรัม GAE/กรัมของส่วนสกัด ตามมาด้วยส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยน้ำ และเฮกเซน ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Stewart et al. (2013) ที่พบว่าในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของเสม็ดแดงมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 149.789 ± 0.381 มิลลิกรัม GAE/กรัม น้ำหนักแห้ง จากนั้นนำทุกแฟรกชันไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้ในการตัดสินใจเลือกไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมักจะมีหลายๆ กลไกในการยับยั้ง จึงจำเป็นที่จะต้องทดสอบมากกว่าหนึ่งวิธี จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้มากที่สุด (EC_{50} = 0.071 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทยังมีค่า FRAP สูงที่สุด (890.885 ± 4.724 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox/กรัมของส่วนสกัด) Gohar et al. (2013) ผู้ซึ่งทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของ *Callistemon viminalis* ซึ่งเป็นพืชวงศ์

เดียวกันกับเสม็ดแดง พบสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น methyl gallate, catechin, gallic acid, ellagic acid รวมทั้งสารประกอบฟีนอลอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจึงถูกเลือกที่จะนำไปแยกต่อโดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์เพื่อที่จะศึกษาแฟรกชันที่มีฤทธิ์ต่อไป

ในส่วนของโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทถูกเลือกมาทำต่อในส่วนนี้ เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าส่วนสกัดอื่นๆ โดยส่วนสกัดนี้จะถูกตรวจสอบเบื้องต้นด้วย TLC เพื่อที่จะเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปลงคอลัมน์ โดยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับนำมาแยกสารคือ เอทิลอะซิเตทผสมกับเฮกเซน และเมทานอลผสมกับเอทิลอะซิเตท หลังจากผ่านสารสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทลงไปในคอลัมน์ สามารถเก็บแฟรกชันย่อยได้ 8 แฟรกชัน ได้แก่ แฟรกชัน FSG1 ถึง FSG8 โดยแฟรกชัน FSG6 ให้ %yield มากกว่าแฟรกชันอื่นๆ (34.35%) จากนั้นนำแฟรกชันย่อยทุกแฟรกชันไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกครั้งหนึ่ง แฟรกชัน FSG7 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุดถึง 94.36% ตามมาด้วยแฟรกชัน FSG5 (91.68%) ซึ่งฤทธิ์ดีกว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท (49.62%) ในขณะที่แฟรกชัน FSG5 มีค่า FRAP เท่ากับ 767.373 ± 3.272 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox/กรัมของส่วนสกัด ซึ่งลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับตอนที่เป็นส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (890.885 ± 4.724 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox/กรัมของส่วนสกัด) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

4.2 สรุปผลการวิจัย

สารออกฤทธิ์จากใบเสม็ดแดงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงกว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนก็ไม่ต่างจากส่วนสกัดย่อยเดิมมากนัก ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเสริมฤทธิ์กันของสารต่างๆ ที่มีอยู่ในแฟรกชันนี้ จากผลการศึกษานี้เป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมาประยุกต์ใช้ในทางโภชนาการและทำเป็นอาหารเสริมด้วยความที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีและมีสารประกอบฟีนอลในปริมาณมาก ซึ่งน่าจะสามารถพัฒนาไปเป็นอาหารฟังก์ชัน (functional food) ต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม แฟรกชันนี้ควรจะนำไปแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยละเอียดแล้วนำมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอีกครั้งหนึ่ง

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ 2559A10802022

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดย่อยจากใบเสม็ดแดงในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด

(มูลนิธิชัยพัฒนา)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 27 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2559

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	49,500.00	0.00	49,500.00	49,500.00	0.00
2. ค่าจ้าง	40,250.00	28,750.00	69,000.00	69,000.00	0.00
3. ค่าวัสดุ	94,215.22	206,931.52	301,146.74	231,500.00	-69,646.74
4. ค่าใช้สอย	1,360.00	74,052.74	75,412.74	145,000.00	69,587.26
5. อุดหนุนสถาบัน	24,750.00	30,250.00	55,000.00	55,000.00	0.00
รวม	**210,075.22**	**339,984.26**	**550,059.48**	**550,000.00**	**-59.48**

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	247,500 บาท	เมื่อ 15 ธันวาคม 2558
งวดที่ 2	198,000 บาท	เมื่อ 16 กันยายน 2559
รวม	**445,500 บาท**	

....-.....

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน เจ้าหน้าที่การเงินโครงงานวิจัย

บรรณานุกรม

จิรัญญา บุรีมาศ. (2550). ผลของการบริโภคผักเม็กต่อสภาวะเครียดออกซิเดชันในผู้ป่วยเบต้า-ธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. (2542). *ผักพื้นบ้านภาคกลาง*. องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก : กรุงเทพมหานคร.

มาโนช วามานนท์ เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ บรรณาธิการ. *ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน.* พิมพ์ครั้งที่ 2. ม.ป.ท., องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2540.

ลลิตา ธีระสิริ. (2543). *ผักพื้นบ้านต้านโรค*. (พิมพ์ครั้งที่1). รวมทรรศน์: กรุงเทพมหานคร.

สมพร ภูติยานันต์.ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. เชียงใหม่:ตุลย์การพิมพ์; 2546.

อรพรรณ มาตังคสมบัติ. ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Dietary supplement). ใน: ศิรินทรา กอแสงเรือง, ภาริณี สิงห์ประสาทพร, วาสินี ลิ่มวงศ์, กุสาวดี เมลืองนนท์, ทิพย์สุชน เอี่ยมสะอาด; บรรณาธิการ. *การประชุมวิชาการเภสัชศาสตร์ เรื่อง ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร.* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ร่วมกับ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. 4-5 กันยายน 2546.

อุไร จิรมงคลการ. (2547). *ผักพื้นบ้านเล่มที่ 1*. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พลับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน): กรุงเทพมหานคร.

อุไร จิรมงคลการ. (2547). *ผักพื้นบ้านเล่มที่ 2*. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พลับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน): กรุงเทพมหานคร.

Andarwulan N, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. Food Chem. 2010;121(4),1231-1235.

Banmonan RH, et al. Introduction: Traditional medicine and health care coverage, Geneva: WHO; 1983.

Benzie IFF and Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. Anal. Biochem. 1996;239:70-76.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igic R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). Food Chem. 2008;111:925-929.

Brand-Williams W, Cuvelier E, and Berset CM. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 1995;28:25-30.

Fuhrman B, Volkova N and Aviram M. Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterolbiosynthesis in macrophages. J. Nutr. Biochem. 2005;16,570-576.

Gohar AA, Maatooq GT, Gadara SR, Aboelmaaty WS. One new pyrroline compound from *Callistemon viminalis* (Sol. Ex Gaertner) G. Don Ex Loudon. Nat. Prod. Res. 2013;27(13),1179-1185.

Hossain MA and Rahman SMM. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. Food Res. Int. 2011;44(3),672-676.

Kukongviriyapan U, Luangaram S, Leekhaosoong K, Kukongviriyapan V, Preeprame S. Antioxidant and vascular protective activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. Biol. Pharmaceu. Bullet. 2007;30(4),661-666.

Maisuthisakul P, Pasuk S, Ritthiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. J. Food Compos. Anal. 2008;21,229–240.

Petchlert C, Wongla S, Phumphinicha J. Antioxidant capacity of indigenous plant extracts from Ban Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) at Chantaburi Province. In *Proceedings of the 5th International conference on Natural Products for Health and Beauty,* 2013; 217-221.

Pothitirat W, Chomnawang MT, Supabphol R, Gritsanapan W. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging andanti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruitrind at two stages of maturity. Fitoter. 2009;80,442-447.

Pramanik KC, Bhattacharya P, Biswas R, et al. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of leaf extract of *Pluchea indica* Less. Orient. Pharm. Exp. Med. 2006a; 6(3):232-236.

Roslida AH, Erazuliana AK and Zuraini A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L) Less leaf. Pharmacol. (Online) 2008;2:349-360.

Ruch RJ, Cheng SJ, and Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogen. 1989;10:1003-1008.

Sreejayan N, and Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. J. Pharm. Pharmacol. 1997;49,105-107.

Stewart P, Boonsiri P, Puthong S, Rojpibulstit P. Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. BMC Compl. Alter. Med. 2013;13,60 (1-11).

Sugimoto S, Matsunami K and Otsuka H. Medicinal Plants of Thailand. I Structures of rheedeiosides A—D and *cis*-entadamide A β-D-glucopyranoside from the seed kernels of *Entada rheedei*. Chem. Pharm. Bull. 2011;59(4):466-471.

Thepmongkon K, Rungreungburanakul K, Petchlert C. (2013). Antioxidant effect of some edible plants from Ban Ang-Ed Official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) at Chantaburi Province. In Proceedings of 5th Science Research Conference, 1-5. March 4th-5th, 2013 at University of Phayao, Phayao, Thailand, BIO5-BIO10.