

การศึกษาพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย

พิธีกรรม อภิชาติยานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

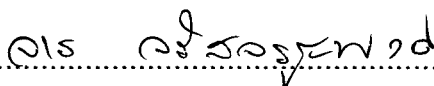
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

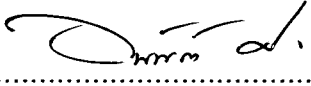
พฤษภาคม 2560

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

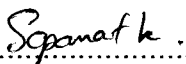
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ พริยะภรณ์ อภิชาตยานนท์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

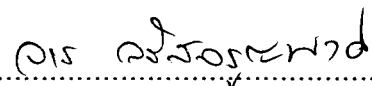
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จเร จรัสจรรยาพงศ์)

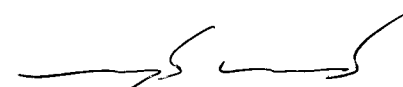

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธาน
(ดร.โสภณัฐ คงศรีประพันธ์)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จเร จรัสจรรยาพงศ์)


..... กรรมการ
(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาควิมิ พระประเสริฐ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ ๗ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๑

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษา

โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์

จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ระดับปริญญาโท ภาคพิเศษ ปีการศึกษา (ฤดูร้อน) 2557

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จร จรัสจรรยาพงศ์ และ ดร.อนันต์ อธิพรชัย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทาง ที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัยพร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชา เคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และ คณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ให้การ สนับสนุนทุนการศึกษา และทุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาเคมีศึกษาทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการแนะนำ ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อชาญยุทธ อภิชาดยานนท์ คุณแม่ประภาพรรณ์ สัจจาศิลป์ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูตเวทิตาแด่ บุพการี บुरพอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

พิริยะภรณ์ อภิชาดยานนท์

57920068: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: จิงจูฉ่าย/ พฤษเคมี/ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส/
ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

พิธีกรรม อภิขัตยานนท์: การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย (PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES FROM THE AERIAL PARTS OF *Artemisia lactiflora*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จเร จรัสจรรยาพงศ์, Ph.D.; อนันต์ อธิพรชัย, Ph.D. 79 หน้า ปี พ.ศ. 2560.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล จากการศึกษาพบสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน คูมาริน สเตอรอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และซาโปนิน การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric ตามลำดับ พบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทมีปริมาณมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.54 ± 0.02 mgGAE/ g และ 83.29 ± 3.12 mgQE/ g ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้น 10 mg/ mL เท่ากับ $86.54 \pm 0.01\%$ และจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรตพบว่า ที่ความเข้มข้น 10.00 mg/ mL สารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด ($9.53 \pm 4.01\%$) นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายไม่มีผลในการยับยั้งทั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

57920068: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)

KEYWORDS: *ARTEMISIA LACTIFLORA*/ PHYTOCHEMICAL SCREENING/
ANTIOXIDANT ACTIVITY/ ANTI-TYROSINASE ACTIVITY/
ANTIBACTERIAL ACTIVITY

PIRIYAPORN APICHTYANON: PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL
ACTIVITIES FROM THE AERIAL PARTS OF *Artemisia lactiflora*. ADVISORY
COMMITTEE: JARAY JARATJAROONPHONG, Ph.D.; ANAN ATHIPORNCHAI, Ph.D.
79 P. 2017.

The aims of this research are evaluation of the phytochemical screening, total phenolic content, flavonoid content and biological activities of hexane, dichloromethane, ethyl acetate together with methanol extracts from the aerial parts of *Artemisia lactiflora*. The results showed that six groups of phytochemicals were observed including flavonoids, cardiac glycosides, tannins, coumarins, steroids, terpenoids and saponins. Total phenolic and flavonoid contents of all extracts of *A.lactiflora* were evaluated by Folin-Ciocalteu method using gallic acid as chemical standard and aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric method using Quercetin as chemical standard, respectively. The results indicated that the ethyl acetate extract contained total phenolic and flavonoid content with the highest values of 2.54 ± 0.02 mgGAE/ g and 83.29 ± 3.12 mgQE/ g, respectively. The highest antioxidant activity at 10 mg/ mL using DPPH free radical scavenging method was observed in *A. lactiflora* methanol extract ($86.54 \pm 0.01\%$). moreover, anti-tyrosinase activity using L-DOPA substrates and kojic acid as standard was also studied. It was found that the methanol extract showed the highest antityrosinase activities at 10.00 mg/ mL using L-DOPA ($9.53 \pm 4.01\%$). The crude extracts were also examined the antibacterial activity against the growth of gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, and gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, by Agar disc diffusion method. The results showed that all crude extracts had no inhibitory effect on the growth of both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของพืชสมุนไพร.....	4
การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร.....	5
สารพฤกษเคมี.....	7
สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds).....	7
อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ.....	10
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase).....	13
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร.....	15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	24
แผนการดำเนินงานวิจัย.....	26
วิธีดำเนินการวิจัย.....	27

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	31
การสกัด.....	31
การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น.....	32
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric.....	33
การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content: TFC) โดยใช้วิธี Aluminium trichloride (AlCl ₃) colorimetric.....	35
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging.....	36
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	40
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli และ Staphylococcus aureus ด้วยวิธี Agar disc diffusion.....	43
การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น.....	32
5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ.....	46
สรุปผลการวิจัย.....	46
ข้อเสนอแนะ.....	47
บรรณานุกรม.....	48
ภาคผนวก.....	52
ภาคผนวก ก.....	53
ภาคผนวก ข.....	55
ภาคผนวก ค.....	58
ภาคผนวก ง.....	73
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	79

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 ความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ.....	6
2-2 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดใบสด จิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเมทานอล.....	21
4-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพ.....	31
4-2 การตรวจสอบสารฟฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล.....	32
4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ของ สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid).....	37
4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล.....	38
4-5 ค่า IC50 ของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดหยาบจาก ส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยวิธี DPPH radical scavenging.....	40
4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	41
4-7 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบส่วนเหนือดิน ของจิงจูฉ่าย ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	42
4-8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย Escherichia coli และ Staphylococcus aureus ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโร มีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง).....	43
4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ของ สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid).....	37
4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล.....	38

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-5 ค่า IC50 ของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดหยาบจาก ส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยวิธี DPPH radical scavenging.....	40
4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรด โคจิก โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	41
4-7 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบส่วนเหนือดิน ของจิงจูฉ่าย ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	42
ก-1 น้ำหนักของส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายแห้ง น้ำหนักสารสกัดหยาบ และร้อยละผลผลิต.....	59
ก-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid).....	60
ก-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ ฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัว ทำละลายเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล.....	61
ก-4 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดหยาบจากส่วน เหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล.....	63
ก-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน (Quercetin).....	64
ก-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล.....	65
ก-7 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ของ สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล.....	66
ก-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของ สารมาตรฐานกรดแกลลิก.....	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค-9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจูนำยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน.....	68
ค-10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสาร สกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจูนำยด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน.....	69
ค-11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสาร สกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจูนำยด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท.....	69
ค-12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสาร สกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจูนำยด้วยตัวทำละลายเมทานอล.....	70
ค-13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	71
ค-14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจูนำยด้วย ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	72

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ใบและดอกของจิงจูฉ่าย (<i>Artemisia lactiflora</i>).....	5
2-2 โครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก.....	8
2-3 โครงสร้างของฟลาเวน.....	8
2-4 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่าง ๆ.....	9
2-5 Diphenylpicrylhydrazyl (Free radical).....	12
2-6 Diphenylpicrylhydrazyl (Non radical).....	12
2-7 ชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (Biosynthesis of melanins).....	14
2-8 โครงสร้างสาร acetylenic spiroketal enol ethers epoxide.....	20
2-9 โครงสร้างสาร acetylenic spiroketal enol ethers.....	22
2-10 โครงสร้างสาร Artemisidiyne A.....	23
3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย.....	26
4-1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายใน ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	32
4-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid).....	33
4-3 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายในตัวทำละลาย อินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	34
4-4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซีติน (Quercetin).....	35
4-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายใน ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	36
4-6 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐาน กรดแกลลิก.....	37
4-7 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(%DPPH radical inhibition) ของสารสกัดหยาบจากส่วน เหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและ เมทานอล.....	39
4-8 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต.....	41

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-9 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเฮกเซน.....	44
4-10 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายไคคลอโรมีเทน.....	44
4-11 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเอทิลอะซิเตท.....	45
4-12 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเมทานอล.....	45
ก-1 ดินจิงจูฉ่าย.....	54
ก-2 ใบจิงจูฉ่าย.....	54
ข-1 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเฮกเซน.....	56
ข-2 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายไคคลอโรมีเทน.....	56
ข-3 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเอทิลอะซิเตท.....	57
ข-4 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเมทานอล.....	57
ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (<i>Gallic acid</i>).....	61
ค-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน.....	64
ง-1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเฮกเซน.....	75
ง-2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายไคคลอโรมีเทน.....	76
ง-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเอทิลอะซิเตท.....	77
ง-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำลายเมทานอล.....	78

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมนุษย์เราให้ความสนใจและเอาใจใส่เกี่ยวกับเรื่องสุขภาพกันมากขึ้น เนื่องจากการรับประทานอาหารของมนุษย์เราในทุกวันนี้พบว่า มีความเสี่ยงต่อโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น การรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นประจำมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัว และ โรคมะเร็ง ขณะที่ผู้ที่รับประทานอาหารประเภทพืชผักและผลไม้เป็นประจำมีความเสี่ยงน้อยกว่า (บุหรัน พันธุ์สุวรรณ, 2556) การเอาใจใส่ทางด้านสุขภาพ นอกจากนี้ความงามยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มนุษย์ให้ความสำคัญและเป็นที่ต้องการ ซึ่งปัจจุบันผู้บริโภคได้มีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมจากการใช้เครื่องสำอางที่มีการผสมสารเคมีมาเป็นเครื่องสำอางจากสารสกัดพืชสมุนไพรจากธรรมชาติ เพราะผู้บริโภคเชื่อว่าเครื่องสำอางที่มีการผสมสารเคมีอาจจะมีผลข้างเคียงจากพิษของสารเคมี สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงถูกนำมาศึกษาเป็นลำดับแรก ๆ เพื่อใช้คัดเลือกหาประโยชน์จากสารสกัดสมุนไพรแล้วนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยา (จันทิมา หอมกลบ, 2553) ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติอันอุดมสมบูรณ์มีพืชที่ใช้เป็นสมุนไพรอย่างมากมายนับแสนชนิด ทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและจากการเพาะปลูก

Artemisia lactiflora เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae มีชื่อไทยว่า จิงจูฉ่าย, ดอกแก้วเมืองจีน, แก้วเมืองจีน (เต็ม สมิตินันท์, 2544) ที่ประเทศจีนมีชื่อว่า Bai-Bao-Hao เป็นสมุนไพรที่แพร่หลายในกลุ่มคนจีน และมีการแพร่กระจายไปทั่วเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้รับการยอมรับว่าเป็นพืชที่กินได้และเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ มีการศึกษาที่มุ่งเน้นศึกษาสาร 2 ตัวในจิงจูฉ่าย คือ polyacetylene และสารประกอบฟีนอล ซึ่งสาร polyacetylene เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Nakamura et al., 1998)

จิงจูฉ่ายเป็นพืชล้มลุกหรือไม้พุ่มขนาดเล็ก รากหรือเหง้าใหญ่กระจายกว้าง แดกกิ่งก้านหนาแน่นแผ่กว้าง คลุมดิน เนื้อใบหนา มีกลิ่นหอม รสขมเล็กน้อย ดอกมีสีขาว ชาวจีนนิยมนำไปทำเป็นอาหารรับประทานในประเภทแกงจืดทั้งหลาย หรือผัดผัก แต่โดยส่วนใหญ่จะใส่ในต้มเลือดหมู เพื่อช่วยดับกลิ่นคาว

แต่อย่างไรก็ตามพืชชนิดนี้ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่รู้จักของคนโดยทั่วไป อีกทั้งรายละเอียดต่าง ๆ เกี่ยวกับพืชชนิดนี้ยังมีผู้ทำการศึกษาไว้น้อยมาก การวิจัยนี้จึงมุ่งทำให้พืชชนิดนี้เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางมากขึ้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และเมทานอล (Methanol) เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทำให้ทราบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย
2. ทำให้ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย
3. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย

ขอบเขตของงานวิจัย

1. เตรียมส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล
2. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย

3. หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัด
หยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย

4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของส่วนสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) คือ กิจกรรมชีวสาร ปฏิกริยาทางชีวภาพ และ
สมบัติทางชีวภาพที่เกิดขึ้นและเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต

2. สารพฤกษเคมี คือ สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็น
สารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สารพฤกษเคมี เหล่านี้
หลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคบางชนิด

3. สารสกัดหยาบ คือ สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธี
การสกัด ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาประกอบการดำเนินการตามลำดับ ดังนี้

1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของพืชสมุนไพร
2. การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร
3. สารพฤกษเคมี
4. สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)
5. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)
6. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ
7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร
8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของพืชสมุนไพร

จิงจูฉ่าย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Artemisia lactiflora* เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae มีชื่อเรียกอื่น ๆ ว่า ดอกแก้วเมืองจีน ดอกไม้เมืองจีน (เต็ม สมิตินันท์, 2544) จิงจูฉ่ายเป็นพืชไม้ล้มลุกหรือไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 0.5-1 ฟุต รากหรือเหง้าใหญ่กระจายกว้าง แตกกิ่งก้านหนาแน่นแผ่กว้างคลุมดิน เนื้อใบหนา สีเขียวสด มีกลิ่นหอม รสขมเล็กน้อย ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับ ก้านใบยาว ขอบใบหยักลึกเป็น 5 แฉก หรือเป็นรูปนิ้วมือ ขอบใบเป็นฟันเลื่อย แต่ละใบแยกซี่ ก้านดอกแตกใหม่ยาวระหว่าง 3 ถึง 10 ซม. ดอกมีสีขาวส่งกลิ่นหอมในฤดูหนาว (ภาพที่ 2-1) การปลูกจิงจูฉ่ายจะใช้เมล็ดในการปลูก ปลูกได้ในดินทั่วไป เป็นไม้ชอบแดดอ่อน ๆ ไม่ชอบน้ำท่วมขังและชอบอากาศเย็น ปลูกได้ตลอดทั้งปี ใบและก้านใบนำไปปรุงอาหาร เช่น แกงจืดและผัดผัก หรือคั้นเป็นน้ำและดื่มกิน สรรพคุณทางยา ป้องกันโรคมะเร็งได้ (Nakamura et al., 1998)



ภาพที่ 2 1-ใบและดอกของจิงจูฉ่าย (*Artemisia lactiflora*)

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร (วัชรพงษ์ ทะสะสังคินทร์, 2556)

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธีการ สำหรับการสกัดเบื้องต้นจะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดหยาบ ซึ่งสารสกัดหยาบเป็นสิ่งที่ได้จากการสกัดสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลาย สารสกัดหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร ซึ่งจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาซึ่งมักเรียกว่าสารสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งเรียกว่าสารเนื้อ โดยชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสถานะที่ใช้ในการสกัด สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) (สุรางค์รัตน์ แแดงจระ, 2558)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด ได้แก่ เมทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน หรือเฮกเซน ซึ่งการสกัดโดยวิธีนี้จะใช้กับพืชที่ไม่สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำได้

การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลาย จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้ โดยการหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ในการสกัดจะใช้เวลานาน 7 วัน หรือตามกำหนดในเภสัช หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ระหว่างทำการหมักนั้นควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกากออกจากตัวทำละลาย การสกัดแบบนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย จึงเป็นวิธีการที่ประหยัดและคุ้มค่า

2. การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการสกัดสารสำคัญจากพืชนั้น จะต้องเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการจะแยก ซึ่งมีหลักที่ควรพิจารณาในการเลือกตัวทำละลาย ดังต่อไปนี้

2.1 คุณสมบัติของสารที่ต้องการสกัด เช่น ความมีขี้ของสาร ความคงตัวของสารในตัวทำละลายนั้นในอุณหภูมิสูง

2.2 มีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี

2.3 ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของสารผสมที่ถูกสกัดนั้น

2.4 ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ

2.5 สามารถแยกออกจากตัวถูกละลายได้ง่ายภายหลังที่สกัดแล้ว

2.6 ไม่ควรทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด

2.7 ตัวทำละลายควรมีราคาไม่แพงมาก

ความมีขี้ของตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืช แสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ความมีขี้ของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ความมีขี้	ตัวทำละลาย
ไม่มีขี้	ปิโตรเลียมอีเทอร์
	เฮกเซน
	คาร์บอนเตตระคลอไรด์
	เบนซีน
	ไดคลอโรมีเทน
	คลอโรฟอร์ม
	ไดเอทิลอีเทอร์
	เอทิลเอซิเตต
	อะซิโตน
	1-โพรพานอล
	เอทานอล
	เมทานอล
มีขี้	น้ำ

สารพฤกษเคมี

สารประกอบทางเคมีในพืช (Phytochemistry) หมายถึง สารประกอบที่พืชสร้างขึ้นด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึม รวมทั้งสารอนุพันธ์ต่างๆ ของสารเหล่านี้ที่ถูกสร้างขึ้นด้วย สารประกอบที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) เป็นสารที่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) รวมทั้งสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ นอกจากนี้ยังมีการหายใจ (Respiration) ที่มีสารประกอบต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมาย และมีการสร้างพลังงานด้วย ได้แก่ สารพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน น้ำมันหอมระเหย

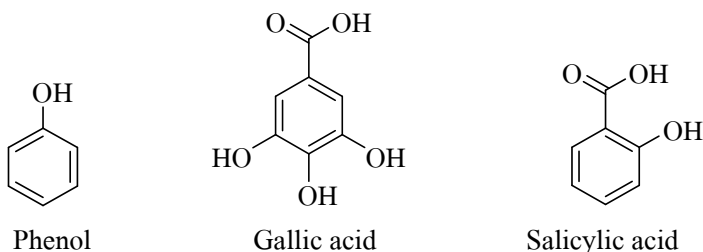
2. สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เป็นสารที่ได้มาจากการนำสารปฐมภูมิ มาเข้าสู่กระบวนการชีวสังเคราะห์ เพื่อสร้างสารชนิดต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตอีกทอดหนึ่ง สารทุติยภูมิมีหลายชนิด ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Anthraquinone glycoside) มีฤทธิ์เป็น ยาระบาย สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้านการอักเสบ และเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย แอลคาลอยด์ (Alkaloids) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ และด้านมะเร็ง เป็นต้น

สารพฤกษเคมีที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เพราะสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่าอนุมูลอิสระ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคร้ายไข้เจ็บที่ร้ายแรง เช่น โรคมะเร็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

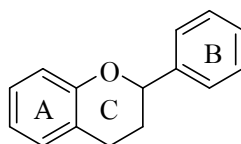
สารประกอบฟีนอลิกหรือสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenol) เป็นสารกลุ่ม Secondary metabolite ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิดโดยทั่วไปมีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าหรือเท่ากับ 1 หมู่เกาะกับวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic-ring) ดังภาพที่ 2-2 สารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 1 หมู่นิยมเรียกว่า สารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenol) โดยส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่ละลายน้ำ มักพบอยู่กับน้ำตาลในรูปไกลโคไซด์ โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่หรือ โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ น้ำตาลที่พบมากสุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ กลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบอื่น เช่น กรดคาร์บอกซิลิก กรดอินทรีย์ เอมีน และไขมัน การสร้างสารประกอบฟีนอลิกของพืชจะมีทั้งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการเพาะปลูก ระดับ

ความสุก กระบวนการแปรรูปหรือแม้แต่กระบวนการเก็บรักษาที่ล้วนแต่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งสิ้น (ชนากร มณีฉาย, 2556)



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างสารประกอบฟีนอลิก

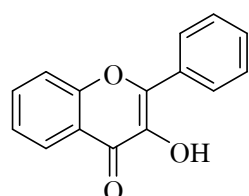
ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ พบสารในกลุ่มโพลีฟีนอลมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติ นับจากโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิล โพรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลีเมอร์ที่มีความซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น โดยคุณสมบัติทางโครงสร้างที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มนี้ โดยจะกล่าวเฉพาะ สารกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และกรดโพลีฟีนอลิกที่สำคัญและพบได้บ่อย สารฟลาโวนอยด์พบอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช เช่น ใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกไม้ ดอก ผล หรือเมล็ด เป็นต้น ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารสำคัญของกลุ่มโพลีฟีนอลมีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาเวน (Flavan หรือ 2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันเป็นระบบ $C_6C_3C_6$ โดยมีวงเบนซีน 2 วง จับกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งอาจเป็นการ จัดเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 2-3



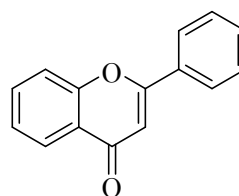
ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของฟลาเวน

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม ตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้าง โดยเฉพาะที่วงซึ่งเป็นวงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซิลแทนที่วงอะโรมาติกใน โมเลกุล ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

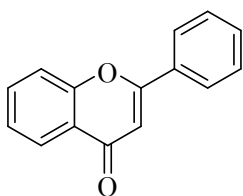
ได้แก่ Flavonol Flavones Flavanone Flavononol Isoflavane Isoflavonone Isoflavonol Isoflavone Chalcone Dihydrochalcone และ Coumarin ดังแสดงโครงสร้างหลักของสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2-4



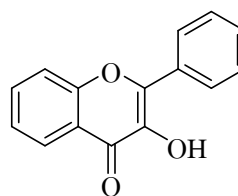
Flavonol



Flavones



Flavanone

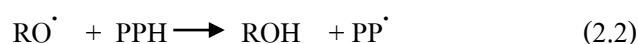
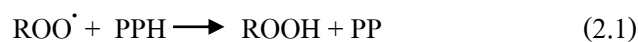


Flavononol

ภาพที่ 2-4 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่าง ๆ

จากสูตรโครงสร้างหลักนี้ จะมีหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งต่าง ๆ โดยเฉพาะที่ วง A และ B ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ไฮดรอกซี เมททอกซี และน้ำตาลต่าง ๆ (ในกรณีที่เป็นไกลโคไซด์) การแทนที่ของหมู่ต่าง ๆ เหล่านี้ตำแหน่งต่าง ๆ ทำให้เกิดเป็นสารฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมาก (ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง, 2552)

สมบัติการต้านออกซิเดชันโดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ ดังสมการที่ 2.1-2.2



เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้วอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ยิ่งไปกว่านั้น

อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังไม่สามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นอีกด้วย จึงทำให้สามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ 2 เท่า ดังปฏิกิริยาที่ 2.3-2.4



แต่ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกยังขึ้นอยู่กับระบบด้วย ดังนั้นการศึกษาหรือเปรียบเทียบคุณสมบัติดังกล่าวจึงจำเป็นต้องระบุรายละเอียดของระบบให้ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัณฐานที่เป็นเป้าหมายของระบบ นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะที่มีสารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้นสูง ความเป็นกรดต่ำสูง และมีเหล็กอยู่ด้วย สารประกอบฟีนอลิก อาจจะเป็นตัวเริ่มต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันเสียเองได้ (ชนากร มณีฉาย, 2556)

อนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระและการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

(บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

1. อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอน โดเดเดี่ยว (Unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์หรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้ จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Immune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น จากมลภาวะ เช่น คาร์บอนหรือ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนโตรออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูงการนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้

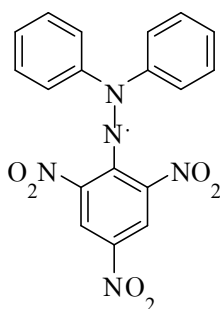
2. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีผลสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมาย หลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ เสริมฤทธิ์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สีและรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ซึ่งเป็นที่ตั้งของเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ร่างกายของคนเราจะมีกระบวนการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีนและแคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวได้จากพืชผักและผลไม้

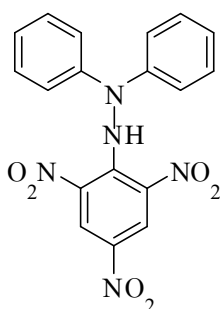
3. การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธีแต่ในที่นี้จะกล่าวถึงคือ DPPH assay 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) (ปริยพันธ์ บัวสด, 2549) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งใช้สารตัวอย่าง คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical ในตัวทำละลาย Methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วงคล้ำที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

DPPH คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นอนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถที่จะรับอิเล็กตรอนได้อีกเพื่อเปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2-5 และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2-6



ภาพที่ 2-5 Diphenylpicrylhydrazyl (Free radical)

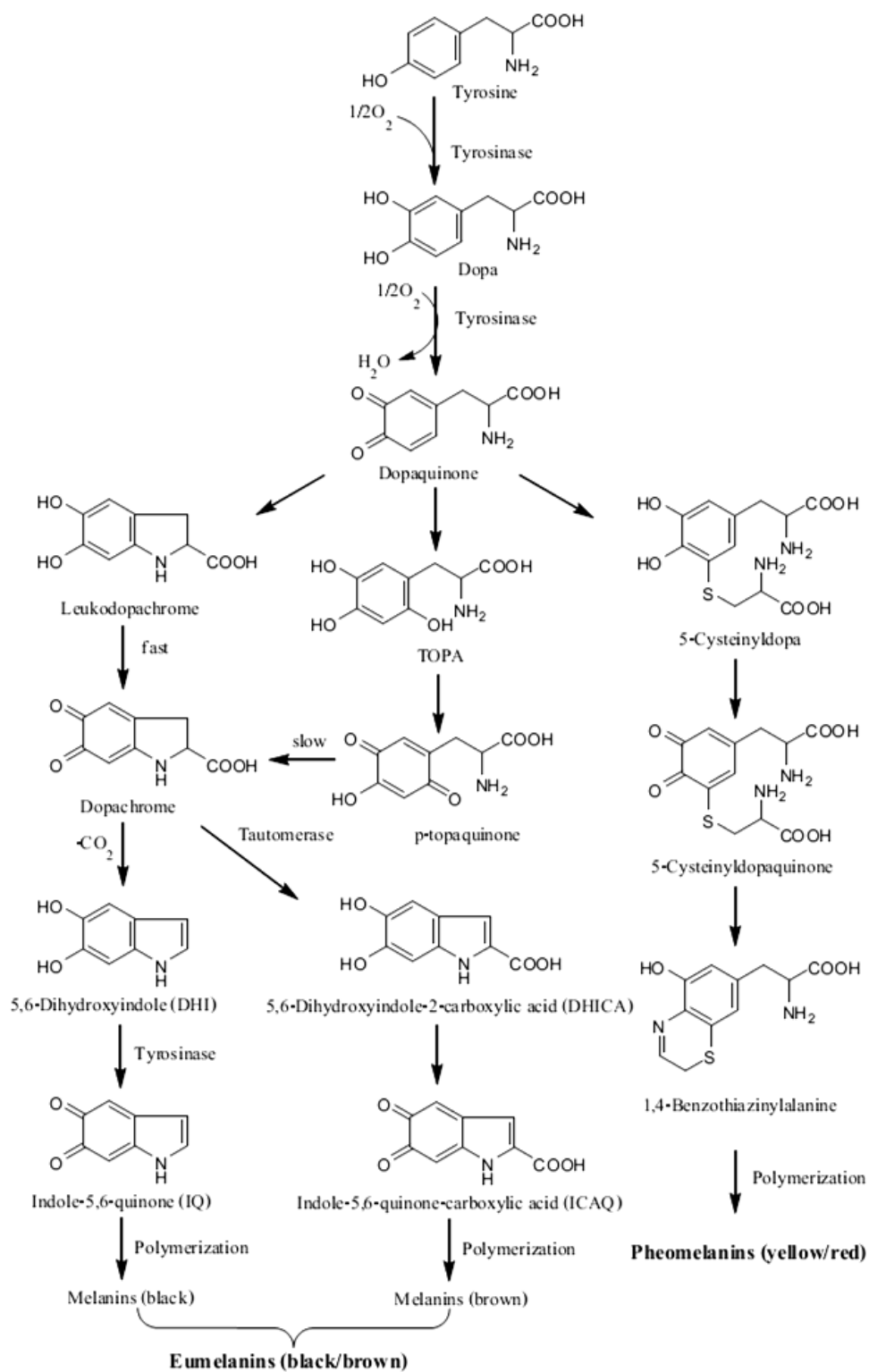


ภาพที่ 2-6 Diphenylpicrylhydrazyl (Non radical)

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณสารตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (DPPH) ในระยะเวลาที่กำหนด ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตเมตรค่าดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ ในมนุษย์ เอนไซม์ไทโรซิเนสเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสีน้ำตาลหรือน้ำตาลของผิวหนังหรือ เส้นผม ในพืช ไทโรซิเนสช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างสีน้ำตาลดำซึ่งเกี่ยวข้องกับการหมองคล้ำของสี ผักผลไม้ ในสัตว์พวกแมลงบางชนิดเอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย (กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, 2551) ซึ่งกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยปกติ ผิวหนังจะมีกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งผลิตโดยเมลานโนไซต์พบได้ในชั้นล่างสุดของ ผิวหนังชั้นกำพร้า การสังเคราะห์เมลานินภายในเมลานโนไซต์ต้องอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนสใน กระบวนการผลิตเมลานิน โดยเมลานินที่สร้างขึ้นแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ยูเมลานิน (Eumelanin) เป็นสารให้สีน้ำตาลหรือน้ำตาลค่อนข้างดำพบในคนเอเชียและแอฟริกา และฟีโอมเมลานิน (Pheomelanin) ให้เกิดผิวสีเหลืองหรือขาวพบได้ในคนยุโรป เม็ดสีเมลานินมีหน้าที่ในการป้องกัน ผิวหนังจากรังสียูวีโดยการดูดซับรังสีเอาไว้ ส่งผลให้คนผิวดำซึ่งมีเม็ดสีเมลานินมากกว่าคน ผิขาวได้รับอันตรายจากรังสียูวีได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับคนผิขาว กระบวนการสร้างเม็ดสีทั้ง 2 ชนิดนั้น เริ่มต้นจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซินซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น โดยมี เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเป็น 2,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอลานีน (2,4 -Dihydroxyphenylalanine) หรือ เอล-โดปา (L-DOPA) และจะถูกเปลี่ยนเป็น โดปาคิวโนน โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดปาคิวโนนที่สร้างขึ้นนี้จะถูกเปลี่ยนเป็น โดปาโครม (Dopachrome) และเกิด ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไลเซชันอีกหลายขั้นตอนจนได้เม็ดสี 2 ชนิด ดังภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-7 ชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (Biosynthesis of melanins) (นิตา จุลโพธิ์, 2559)

สัดส่วนของยูเมลานินและฟีโอเมลานินในแต่ละคนนั้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อชาติ และพันธุกรรมรวมถึงการได้รับรังสียูวีจากแสงแดดซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเม็ดสี เมลานินเพิ่มมากขึ้น การสร้างเม็ดสีเมลานินที่มากเกินไปส่งผลต่อการเกิดฝ้า กระ จุดด่างดำของ ผิวหนัง ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนาจึงมีการหาวิธีการบดบังขึ้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการสร้าง เม็ดสีเมลานิน ได้แก่ การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitor) สารกลุ่มนี้สามารถลดหรือยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินได้โดยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและ การใช้สารที่ทำให้ ผิวหลุดลอกออกเป็นแผ่น (Exfoliation) โดยการสลายเคอร์ราตินซึ่งจะกระตุ้น การผลิตเซลล์ผิวหนังชั้นนอกให้หลุดออกได้เร็วขึ้นเซลล์ผิวใหม่ที่เกิดขึ้นจึงดูขาวใสและอ่อนกว่า วยในปัจจุบันผู้คนต้องการให้ผิวของตัวเองมีความขาวใสโดยการใช้สารที่ทำให้ผิวขาว ซึ่งสารที่ทำให้ ผิวขาวที่ได้รับความนิยม ได้แก่ วิตามินซี (Vitamin C) กรดโคจิก (Kojic acid) อาร์บูติน (Arbutin) กรดอะเซลาอิก (Azelaic acid) นอกจากนี้ยังรวมถึงสารสกัดจากพืชต่าง ๆ เช่น สารสกัด จากชาเขียวซึ่งมีสารสำคัญเป็นสารในกลุ่มแคทีชิน (Catechin) และยังมีคุณสมบัติในการ ต้านอนุมูลอิสระอีกด้วยรวมถึงสารอโลซิน (Aloesin) เป็นสารที่สกัดได้จากว่านหางจระเข้ สารกลาบรีดิน (Glabridin) ที่สกัดจากชะเอมเทศ โดยสารจากธรรมชาติเหล่านี้สามารถยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (นิตยา จุลโพธิ์, 2559)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร ได้ดัดแปลงวิธีการมาจากการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านจุลินทรีย์หรือยาปฏิชีวนะ (Koneman et al., 1994) ซึ่งสามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ Dilution Method และ Diffusion Method มีรายละเอียด ดังนี้

Dilution Method

Dilution Method เป็นวิธีหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะเรียกความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้ง จุลินทรีย์นี้ว่า Minimal Inhibition Concentration หรือ MIC ซึ่งการวิเคราะห์หา MIC สามารถทำได้ โดยการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถแบ่ง ออกเป็น 2 วิธี (Ingraham & Ingraham, 1995) คือ การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ ในของเหลว (Broth Dilution Method) และการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง (Agar Dilution Method) ซึ่ง Dilution Method จะให้ผลที่ละเอียดกว่า Diffusion Method แต่ขณะเดียวกันก็ต้องใช้เวลา เครื่องมือ และแรงงานในการทำการทดลองมากกว่า

Diffusion Method

Diffusion Method เป็นวิธีการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ ในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่าสารจะซึมจากที่มีความเข้มข้นสูง ไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น จึงนำสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปแผ่นยาที่เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวงบนอาหารเลี้ยงเพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อยู่ ซึ่งที่นิยมมากที่สุดก็คือ วิธีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc Diffusion Method หรือ Filler Paper Disc) และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นสามารถสังเกตได้จากการที่จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณ โดยรอบที่มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่ (Tortora, Berdell, & Christine, 1995) Diffusion Method เป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้เวลาทดลองน้อย แต่วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลได้โดยตรงเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากที่กล่าวมาแล้วนั้น จะเห็นได้ว่าการที่จะเลือกการทดสอบวิธีใดนั้น จะต้องพิจารณาจากความละเอียดที่ผู้ทดลองต้องการ จำนวนสารสกัดที่จะทดสอบ ปริมาณของสารสกัดที่มีอยู่ ตลอดจนแรงงานงบประมาณในการทดลอง โดยการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีที่เหมาะสมกับการทดลอง คือ Diffusion Method

1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method

Diffusion Method เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไวในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์เพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่สารต้านจุลินทรีย์ปริมาณหนึ่งไว้ในภาชนะบรรจุ (Reservoir) ซึ่งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar Medium) ที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ไว้ ภายหลังจากการบ่มเพาะเชื้อให้สังเกตดูรอบบริเวณภาชนะ ที่ตัวสารต้านจุลินทรีย์ซึมไปนั้นจะมีบริเวณใส (Clear Zone) ที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต โดยบริเวณใสนี้เรียกว่า Inhibition Zone แล้ววัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นจะมีขนาดแคบกว้างแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้นจะเป็นสัดส่วน โดยตรงกับความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอีกด้วย (Mckane, Larry, & Kandel, 1996)

ในอดีตนั้น Diffusion Method เริ่มต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แล้วใช้แท่งแก้วหรือแท่งเหล็กเจาะบนผิววุ้นให้มีช่องเกิดขึ้น จากนั้นเติมสารละลายของสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ใส่ลงไปในช่วงวุ้นเหล่านั้นสารต้านจุลินทรีย์จะแพร่กระจายไปในเนื้อวุ้น โดยสารต้านจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น จุลินทรีย์จะไม่เจริญบริเวณรอบ ๆ บริเวณที่มีสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวอยู่ ซึ่งหากมีบริเวณที่ถูกยับยั้งมากนั้น หมายถึงสารต้านจุลินทรีย์หรือยาชนิดนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิด

นั้นมาก ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 ได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ โดย (Alcamo, 1997) โดยใช้แผ่นกระดาษกรองหรือกระดาษกรองวงกลม (Filter Paper Disc) ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้กันมาก บางครั้งอาจเรียกวิธีการทดสอบที่ใช้แผ่นกระดาษดังกล่าวนี้ว่า Kirby-Bauer Test หรือ Disc Sensitivity Test ดังจะเห็นได้ว่า Diffusion Method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการทดสอบความไวต่อจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้ค่าใช้จ่าย แรงงานและเวลาในการทำการทดลองน้อย แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการด้วยกัน อาทิเช่น วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีอัตราเร็วในการเจริญเติบโตต่ำ หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต และเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะแต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเป็นต้น นอกจากนี้วิธีการทดสอบนี้ยังไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้โดยตรง

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method

ปัจจัยหลายชนิดที่มีผลต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์นั้น โดยบางปัจจัยจะรบกวนการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมของสารต้านจุลินทรีย์ หรือบางปัจจัยที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มากก็จะทำให้ขนาดบริเวณใสลดลงได้ ส่วนบางปัจจัยที่ส่งเสริมการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมสารต้านจุลินทรีย์ หรือพวกที่รบกวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก็จะทำให้บริเวณใสเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงควรตระหนักถึงปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญ มีดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้น จะถูกกระทบจากส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน โดยมีตัวอย่างดังนี้

1. ความเป็นกรด-ด่าง (PH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 6.8-7.2 แต่ถ้า pH ต่ำหรือสูงกว่าระดับนี้จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Pelezar, 1958)
2. บัฟเฟอร์ (Buffer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดนั้น อาจมีผลกระทบต่อฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิดได้ เช่น การทดสอบ Gentamicin ในอาหารซึ่งมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกันก็จะทำให้ได้ผลการตรวจสอบความไวที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถอยู่ได้ในที่มี pH ในช่วงแคบ ๆ ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่านี้ก็จะทำให้ตายได้ เช่น Legionella pneumophila สามารถอยู่ได้ที่ pH 6.85-7.00 ดังนั้น จึงต้องใช้บัฟเฟอร์ช่วยเพื่อไม่ให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เปลี่ยนแปลงไปมากนัก (Nester, Evans, & Martha, 1995)
3. ปริมาณไอออนที่ปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อความไวของเชื้อและการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น ผลของ Aminoglycoside ที่ทำให้บริเวณใส

ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ลดลง นอกจากนี้สำหรับยา Tetracyclines ฤทธิ์ของยาจะลดลงเมื่อปริมาณของ Divalent Cation เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} เพิ่มขึ้น (Koneman et al., 1994)

4. วุ้น (Agar) วุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบของ Polysaccharides ซึ่งสารต้านจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น Cationic จะสามารถจับกับหมู่ Acidic Sulfate ของ Polysaccharides ในวุ้นได้ จึงมีผลทำให้การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์นั้นลดลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับยาในกลุ่ม Polymyxins (Brown & Gilbert, 1995)

5. ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar Medium) โดยทั่วไปจะกำหนดให้มีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ซึ่งไม่ทำให้กระทบต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นมากนัก โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 25 และ 60 มิลลิลิตร ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate) ที่เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 9 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับ จะทำให้ได้ความหนาดังกล่าว ส่วน Plate ที่เท Agar ไว้แล้วถ้าต้องการเก็บไว้ใช้เกิน 5 วัน ควรใส่ถุงพลาสติกแล้วไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4-8 °C แต่ไม่ควรเก็บเกิน 2 สัปดาห์ และก่อนใช้ควรให้พื้นผิว Agar แห้งเสียก่อน (Collins, Lyne, & Grange, 1989)

6. ความชื้นหรือน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีบทบาทโดยตรงต่อจุลินทรีย์เกี่ยวกับ แรงดันออสโมซิสของเซลล์ เพราะผลของแรงดันออสโมซิสที่มีต่อจุลินทรีย์นั้นจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและชนิดของจุลินทรีย์นั้น ๆ เช่น เซลล์ของ *Escherichia coli* น้ำจะแพร่ออกนอกเซลล์ (Plasmolysis) เมื่อเจริญในสารละลายซูโครสเข้มข้น 12% เป็นเวลานาน 5-20 นาที ส่วนเซลล์ของแบคทีเรียพวก *Bacillus* มีความสามารถทนต่อสารละลายของเกลือเข้มข้น 10-15% หรือสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 30-60% ได้ดี (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบนั้น มีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมาก เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์มากเกินไปจะทำให้บริเวณใสมีขนาดเล็กเกินไปได้ ดังนั้น การทดสอบทุกครั้งจึงต้องมีการปรับปริมาณของเชื้อทดสอบให้อยู่ในปริมาณที่แน่นอน และเป็นมาตรฐาน เช่น การปรับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบให้ความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^9 เซลล์/ มิลลิลิตร โดยเทียบกับ 0.5 McFarland Standard (Koneman et al., 1994)

ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc ที่ใช้ทดสอบ

ในกรณีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc) ที่มีสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเอง โดยการชุบ Disc ลงในสารต้านจุลินทรีย์ อาจจะมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc แต่ละอันแตกต่างกัน และจะส่งผลกระทบต่อขนาดของบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์ได้โดยตรง

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งโดยปกติจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 0 °C (Psychrophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 °C (Thermophilic Bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิประมาณ 20-45 °C (Mesophilic acteria) ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ เช่น *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Pelezar, 1958) ดังนั้นแล้วอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จึงควรปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยในกรณีที่ทดสอบความไวของจุลินทรีย์ที่สามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ จะใช้อุณหภูมิในการบ่มเชื้อประมาณ 35-37 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิเฉลี่ยของสัตว์เลือดอุ่น (Kleyn & Bicknell, 1999)

เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการซึมของสารต้านจุลินทรีย์ใน Agar Medium ได้ ดังนั้นภายหลังจากวาง Disc แล้วควรรอ Plate ที่ได้เข้าสู่บ่มเชื้อทันที แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (Collins, Lyne, & Grange, 1989)

บรรยากาศขณะบ่มเชื้อ

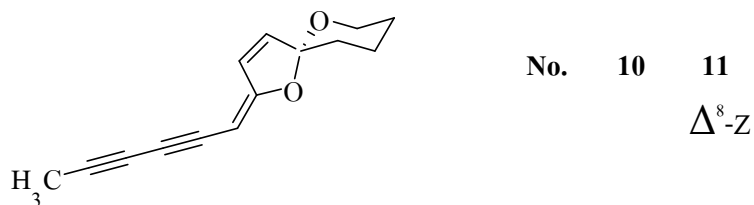
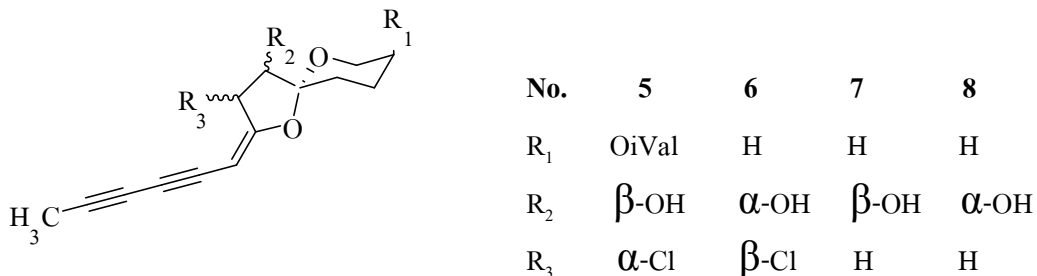
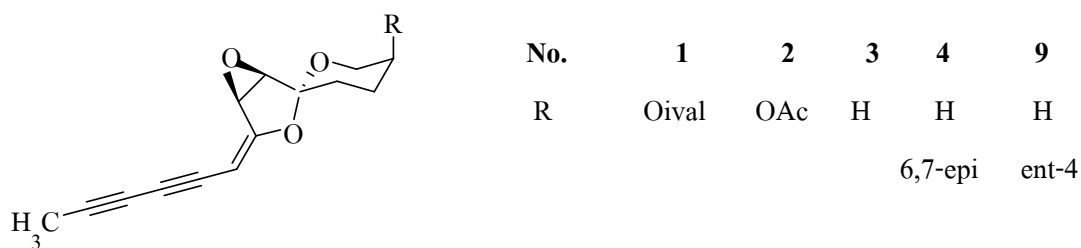
บรรยากาศขณะบ่มเชื้อมีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเมื่อบ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้เกิด Carbonic Acid บนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะกรดขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น มีความสำคัญอย่างมากที่จะทำให้ผลที่แปรออกมาผิดหรือถูกได้เช่นกัน โดยทั่วไปการวัดขนาดบริเวณใสต้องการความละเอียดเป็นค่ามิลลิเมตร ซึ่งจะวัดได้โดยใช้ไม้บรรทัดคาลิปเปอร์ หรือเครื่องมือไฟฟ้า นอกจากนี้การที่ขอบบริเวณส่วนใสไม่ชัดเจน คือ ขอบริม ๆ ที่ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ยังเจริญประปรายหรือเชื้อจุลินทรีย์ถูกยับยั้งไม่หมด การวัดขนาดบริเวณใสในลักษณะนี้จะต้องวัดเฉพาะขอบนอกที่ใสสม่ำเสมอ (Ingraham & Ingraham, 1995)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nakamura et al. (1998) ทำการศึกษาแยกโครงสร้างสาร acetylenic spiroketal enol ethers จากพืชในวงศ์ Asteraceae ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artemisia lactiflora* โดยการนำส่วนใบสด น้ำหนัก 1 กิโลกรัม มาสกัดโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายได้สารสกัดหยาบด้วยเมทานอล 30 กรัม ทำการแยกสารและทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC on Nova Pak C₁₈ และยืนยันโครงสร้างด้วยเครื่อง ¹H NMR จากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบสารทั้งหมด 11 โครงสร้าง ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diacetylenic spiroketal enol ether epoxide ดังภาพที่ 2-8 และทำการตรวจสอบความเป็นพิษของ สารสกัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ผลการทดสอบดังตารางที่ 2-2



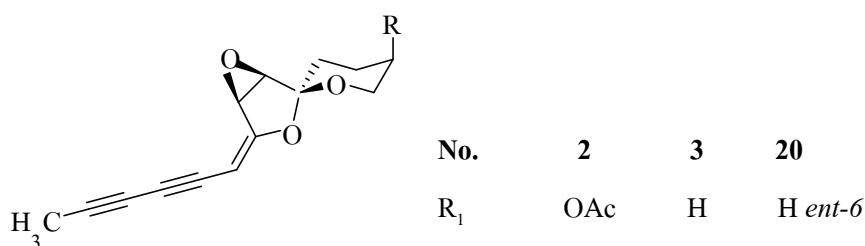
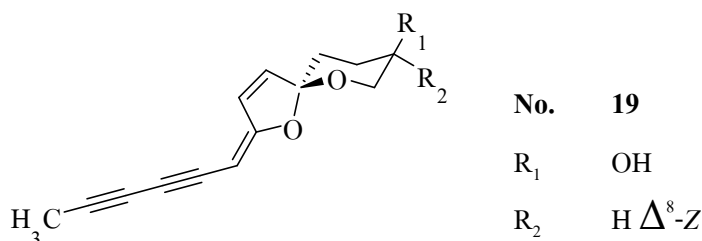
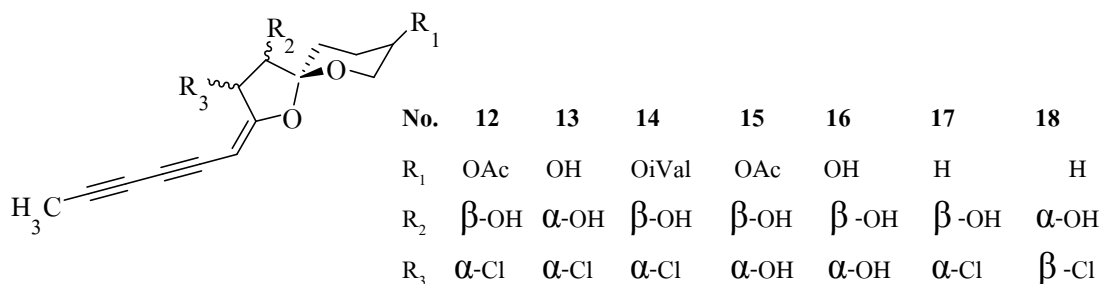
ภาพที่ 2-8 โครงสร้างสาร acetylenic spiroketal enol ethers epoxide

ตารางที่ 2-2 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดใบสด
 ึงจุน่ายด้วยตัวทำละลายเมทานอล

โครงสร้างสาร	ค่า IC ₅₀ (μM)
1	7.6
2	29
3	47
4	43
5	28
6	56
7	>100
8	-
9	50
10	>100
11	>100

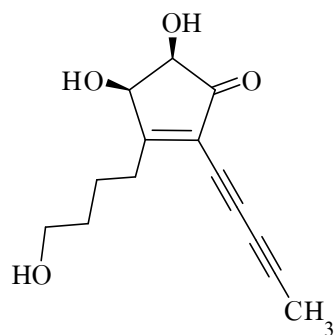
หมายเหตุ	ค่า IC ₅₀	หมายถึง	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ 50%
	>100	หมายถึง	สารสกัดมีความเข้มข้นมากกว่า 100 μM ที่มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ 50%
	-	หมายถึง	ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

Ma et al. (2011) ทำการศึกษาสกัดแยกสารจากต้น *A. Lactiflora* โดยการทำให้แห้งและ
 เป็นผง จำนวน 10.00 กิโลกรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำส่วน
 สกัดหยาบมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากนั้นทำการแยกสาร
 และทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC (Chiralcel Oj-H column 250x20 mm, 5 μm) และยืนยันโครงสร้าง
 ด้วยเครื่อง ¹³C NMR และ ¹H NMR จากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบสารทั้งหมด 11 โครงสร้าง เป็น
 สารใหม่จำนวน 6 โครงสร้างซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diacetylenic spiroacetal enol ethers ดังภาพที่ 2-9



ภาพที่ 2-9 โครงสร้างสาร acetylenic spiroketal enol ethers

Xiao et al. (2014) ทำการศึกษาสกัดแยกสารและหาโครงสร้างสาร polyacetylene ชนิดใหม่จากต้นจิงจูฉ่าย (*Artemisia lactiflora*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae โดยการนำส่วนเหนือดินของต้นจิงจูฉ่ายที่บดแห้ง น้ำหนัก 10.00 กิโลกรัม มาสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทินแลร์โครมาโทกราฟี (TLC) พบว่า ได้สาร polyacetylene ชนิดใหม่ 1 ชนิด จำนวน 15.0 มิลลิกรัม และทำการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค spectroscopy พบว่ามีโครงสร้างเป็น Artemisidiyne A (ภาพที่ 2-10) จากนั้นได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร Artemisidiyne A โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งจำนวน 4 ชนิด คือ ลำไส้ใหญ่ (HCT-8), กระเพาะอาหาร (BGC-823), ปอด (A549) และเม็ดเลือดขาว (HL-60) ด้วยวิธี MTT method ผลการศึกษาพบว่า สาร Artemisidiyne A เป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ ลำไส้ใหญ่ กระเพาะอาหาร และปอด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.5, 1.1, และ 4.6 μ M ตามลำดับ



ภาพที่ 2-10 โครงสร้างสาร Artemisidiyne A

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) (Buchi, R-200/ 205, Switzerland)
2. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer
3. เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micropipette)
4. แผ่นให้ความร้อน (Hot plate)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (TE214S, Sartorius)
6. เครื่องอ่างไอน้ำ (Water bath)
7. ตู้ดูดความชื้น (Dessicator)
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flasks) ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
9. ปีกเกอร์ (Beakers) ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
10. กรวยกรอง (Glass funnel)
11. กรวยแยก (Separatory funnel) ขนาด 50 มิลลิลิตร
12. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
13. หลอดหยด (Dropper)
14. กระจกนาฬิกา (Watch glass)
15. แท่งแก้วคนสาร (Stairring rod)
16. ปากคีบ (Forcep)
17. คอลัมน์ (Column) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ
18. หลอดทดลอง (Test tube)
19. กระบอกลวด (Cylinders) ขนาด 10, 100 และ 250 มิลลิลิตร
20. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
21. อะลูมิเนียม ฟอยล์ (Aluminium foil)
22. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
23. หลอดคะปิลลารี

24. พาราฟิล์ม

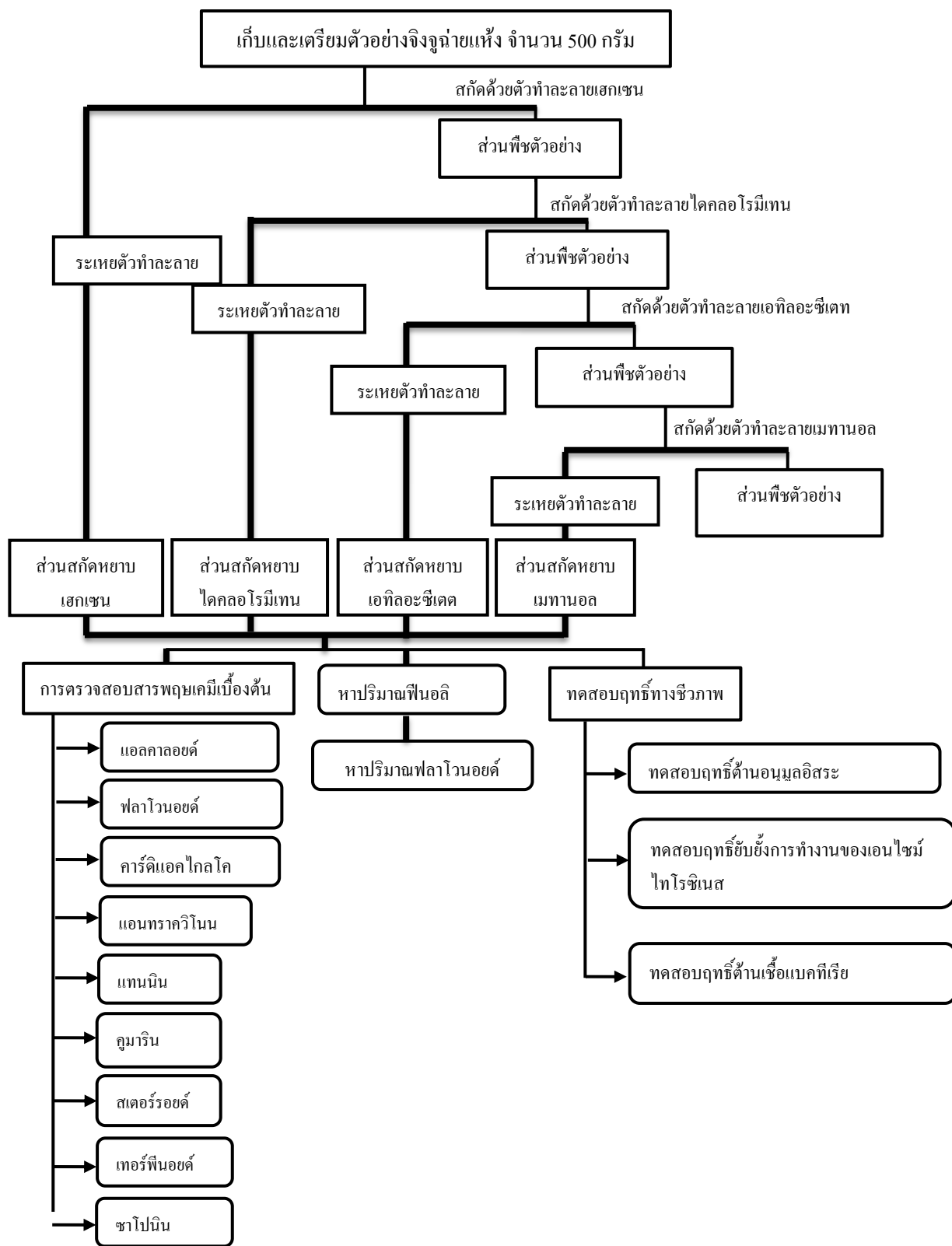
25. แผ่น TLC normal silica gel 60 F₂₅₄ 25 แบบ aluminium sheet 20x20 cm

ยี่ห้อ Merck

สารเคมี

1. เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate, C₂H₅COOCH₃, commercial grade)
2. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH₂Cl₂ commercial grade)
3. เฮกเซน (Hexane, C₆H₁₄, commercial grade)
4. เมทานอล (Methanol, CH₃OH)
5. คลอโรฟอร์ม (Chloroform, CHCl₃)
6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
7. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H₂SO₄)
8. กรดแกลเซียลแอซิดิก (Glacial acetic acid, CH₃COOH)
9. แอมโมเนีย (Ammonia, NH₃)
10. เอทานอล (Ethanol, C₂H₅OH)
11. แผ่นแมกนีเซียม (Mg)
12. กรดแกลลิก (Gallic acid)
13. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
14. เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, FeCl₃)
15. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
16. น้ำกลั่น (Distill water)
17. เควอซิติน (Quercetin)
18. น้ำยาทดสอบคราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent)
19. น้ำยาทดสอบฟอลิน ซีโอแคลตู (Folin-Ciocalteu reagent)
20. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) บริษัท Fuka, Germany
21. Tetracycline
22. 0.85% NaCl
23. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB)
24. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)
25. เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922

แผนการดำเนินงานวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ จิงจูฉ่าย (*Artemisia lactiflora*) ใช้ส่วนเหนือดิน เก็บพืชตัวอย่างจากสวนผักในเขตทวีวัฒนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในช่วงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2559

2. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย ตากผึ่งลมให้แห้งในที่อากาศถ่ายเทสะดวกเป็นเวลา 7 วัน นำไปบดและนำส่วนที่บดไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ให้มีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เปลี่ยนตัวทำละลายทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายโดยใช้ กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบ หมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (Hexane extract) จากนั้น นำกากของพืชที่เหลือมาสกัดโดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane extract) สารสกัดหยาบ เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate extract) และสารสกัดหยาบเมทานอล (Methanol extract) ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบ เพื่อคำนวณหาร้อยละของสารสกัด (%yield) เก็บสารสกัดไว้ในขวดบรรจุสาร สีชา (Vial) เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิตั้งแต่ 2-8 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์

3. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบ ไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเมทานอล 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แอนทราควิโนน แทนนิน คูมาริน สเตอรอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และซาโปนิน จะใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอนโดยคัดแปลงจาก อรุณรัตน์ สันฐิติกวินสกุล (2557) และ ศรีนรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาศ นิยมไทย (2556) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

การตรวจสอบแอลคาลอยด์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 2% 15 mL นำไปอุ่น 2-3 นาที กรองและนำของเหลวที่ได้จากการกรอง ไปทดสอบกับสารแวกเนอร์ (Wagner's reagent) ปรากฏตะกอนสีเหลืองหรือสีน้ำตาลแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายเอทานอล 50% 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

(Conc. HCl) ถ้าเกิดสารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลาย เฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl_3) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดแกลเซียลอะซีติก (Glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบ สารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

การตรวจสอบแอนทราควิโนน ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 10% 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที นำมากรอง แล้วปล่อยให้ สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) 2-3 หยด สังเกตสีชมพูแดงที่เกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

การตรวจสอบแทนนิน ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่าง ควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) 2-3 หยด ลงไปใน ของเหลวที่ได้จากการกรอง หากปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

การตรวจสอบคูมาริน ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 50% เอทานอล 1.0 มิลลิลิตร เขย่าและกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่า พบสารคูมาริน

การตรวจสอบสเตอรอยด์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองมา ค่อย ๆ เติม กรดแกลเซียลอะซีติก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสาร สเตอรอยด์

การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมไดคลอโรมีเทน 2 มิลลิลิตร เขย่า และค่อย ๆ เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสี น้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

การตรวจสอบซาโปนิน ใช้การทดสอบฟอง โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม นำมาเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มให้เดือด กรองและนำของเหลวผลกรอง (Filtrate) มาเติมน้ำกลั่นลงไป 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟอง เกิดขึ้นแสดงว่า พบซาโปนิน

4. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic Content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลง จาก Majhenic, Skerget, and Knez (2007) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยผสม สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 mg/ mL) หรือ สารตัวอย่างที่ต้องการ ทดสอบ 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 บ่มที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจาก กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mg GAE/ g dried extract)

5. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium trichloride (AlCl_3) colorimetric เป็นวิธีการดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat, and Legret (1994) โดยใช้เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน โดยผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 mg/ mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลายอะลูมิเนียม ไตรคลอไรด์ (AlCl_3 reagent) ความเข้มข้น 1.0% (W/ v) ปริมาตร 1.8 mL ให้เข้ากันบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟ มาตรฐานเคอร์ซีตินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE/ g dried extract)

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, and Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซีติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 mg/ mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.05 mg/ mL) ปริมาตร 0.2 mL กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 1.8 mL ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละของสารอนุมูลอิสระ (%DPPH radical inhibition) จากสูตร

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

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีคัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda, and Yonemori (2005) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 mg/ mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 mg/ ml) ปริมาตร 20 μ L กับสารละลาย sodium phosphate buffer (PH 6.8) ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 140 μ L และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 800 U/ mL ใน sodium phosphate buffer (PH 6.8) ปริมาตร 20 μ L ลงในจานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 3.0 mM ปริมาณ 40 μ L ลงในหลุม เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 10 นาที และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) จากสูตร

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

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

8. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion โดยทดสอบแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* โดยส่งทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 4

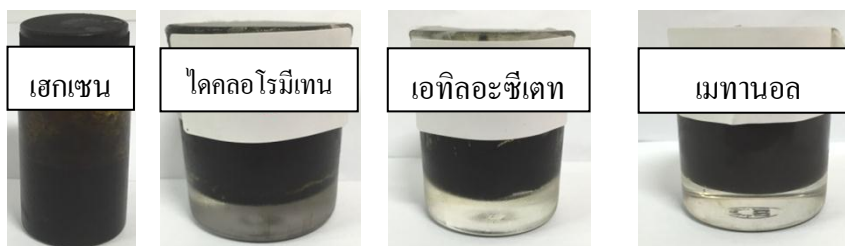
ผลการวิจัย

การสกัด

ส่วนเนื้อดินจึงจุถ่ายแห้ง จำนวน 500 กรัม เก็บจากสวนผักในเขตทวีวัฒนา จังหวัด กรุงเทพมหานคร นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่ อุณหภูมิห้อง เปลี่ยนตัวทำละลายทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (Hexane extract) จากนั้นนำกากของพืชที่เหลือมา สกัดโดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ จะได้ สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane extract) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate extract) และสารสกัดหยาบเมทานอล (Methanol extract) ตามลำดับ ที่มีน้ำหนัก สารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต (%yield) และลักษณะต่าง ๆ ทางกายภาพ ดังตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพ

สารสกัดหยาบจาก ส่วนเนื้อดินของจุถ่าย ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละ ผลผลิต (% yield)	ลักษณะทาง กายภาพ
สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน	8.10	1.62	สีเขียวเข้มหนืด
สารสกัดหยาบด้วยไดคลอโรมีเทน	10.45	2.09	สีเขียวเข้มหนืด
สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท	3.79	0.76	สีเขียวเข้มหนืด
สารสกัดหยาบด้วยเมทานอล	50.61	10.12	สีเขียวเข้มหนืด



ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหายาจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายใน
ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (อรุณรัตน์ ถิ่นจิตติกวินสกุล, 2557) และ (ศรีนรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และศิริมาศ นิยมไทย, 2556) ของสารสกัดหายาจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายที่สกัดด้วยเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล ได้ผลดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหายาจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย
ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล

สารพิษเคมี	ผลการทดสอบสารพิษเคมีของสารสกัดหายาจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย			
	เฮกเซน	ไคคลอโรมีเทน	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล
แอลคาลอยด์	-	-	-	-
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-	-	-	+
แอนทราควิโนน	-	-	-	-
แทนนิน	-	-	-	+
คูมาริน	-	-	-	+
สเตอรอยด์	-	-	+	+
เทอร์ปีนอยด์	-	-	-	+
ซาโปนิน	-	+	+	+

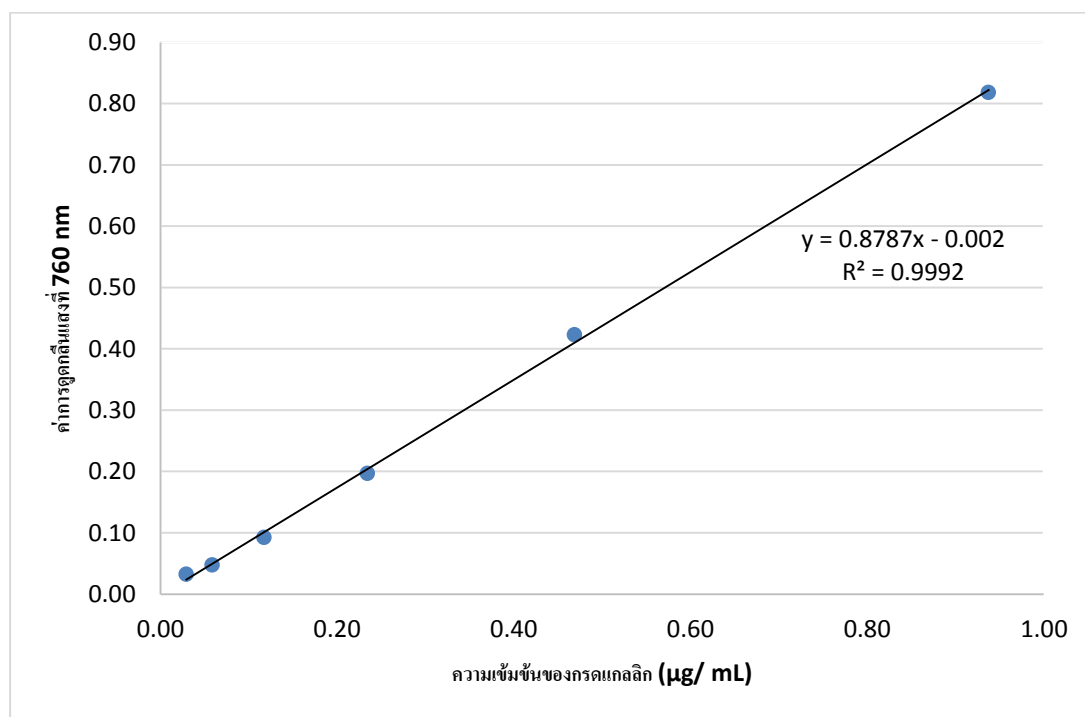
หมายเหตุ + คือ ตรวจสอบพบ - คือ ตรวจสอบไม่พบ

จากการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบสารพฤกษเคมีทั้งหมด 7 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน คูมาริน สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน โดยสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซนพบสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ สารสกัดหยาบด้วยไดคลอโรมีเทนพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และซาโปนิน สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทพบสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ สเตอรอยด์ และซาโปนิน และสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลพบสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน คูมาริน สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน ดังแสดงในตารางที่ 4-2

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC)

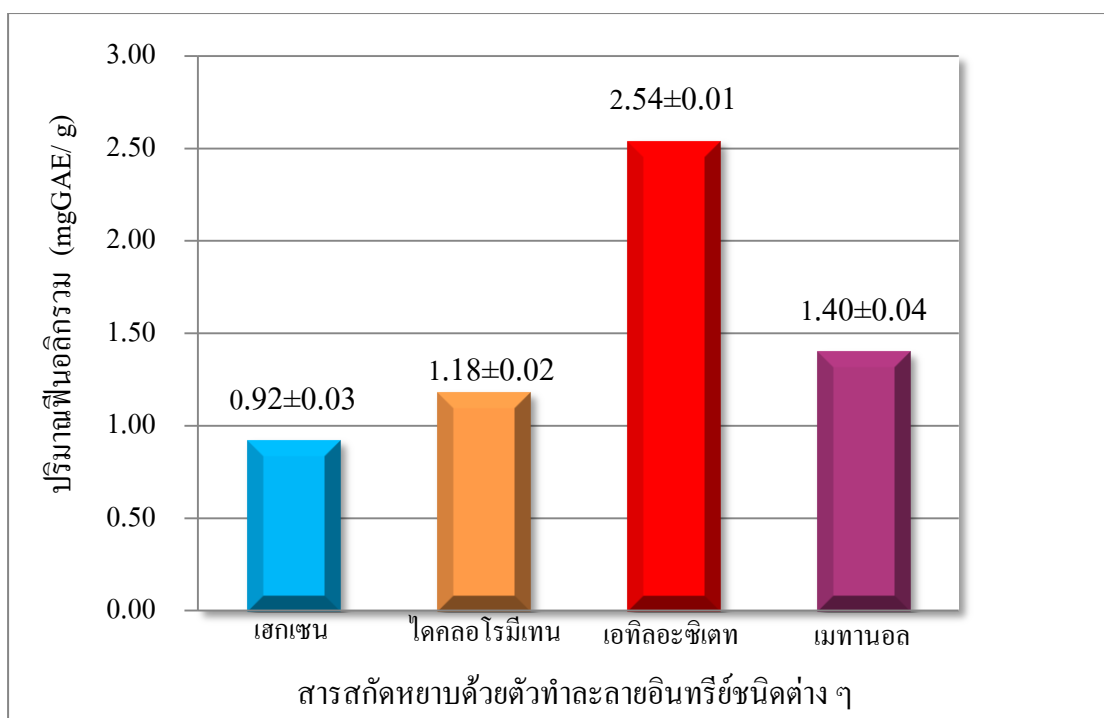
โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic, Skerget and Knez (2007) ซึ่งใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกดังภาพที่ 4-2 ($y = 0.8787x - 0.002$, $R^2 = 0.9992$)



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid)

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.8787x - 0.002$) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเมทานอล ได้ผลดังภาพที่ 4-3 โดยรายงานในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (mgGAE/ g)



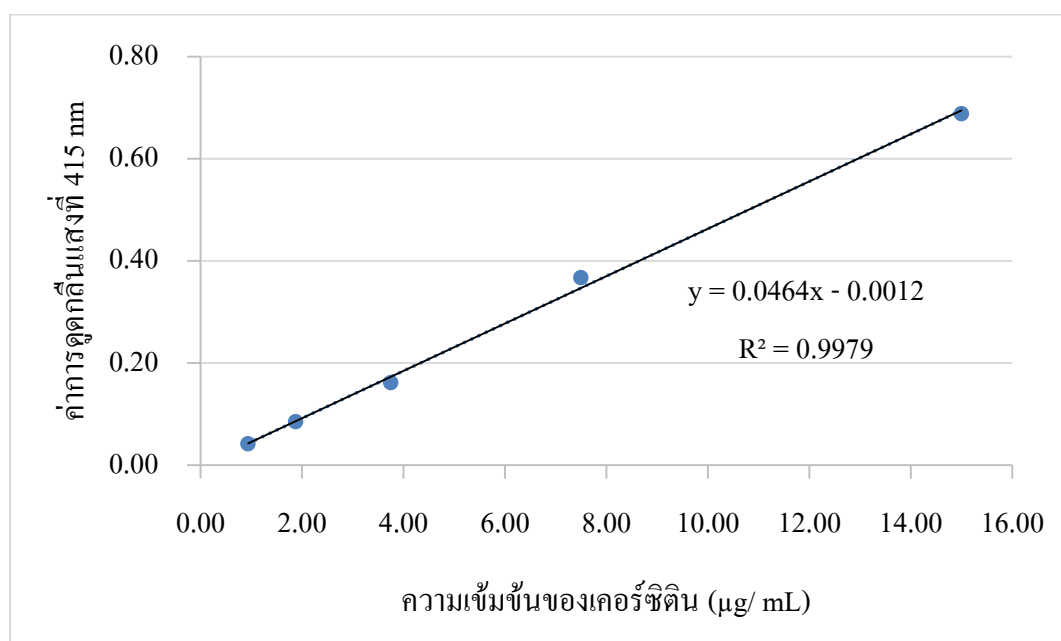
ภาพที่ 4-3 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จากผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด (2.54 ± 0.02 mgGAE/ g) รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเมทานอล (1.40 ± 0.04 mgGAE/ g) สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (1.18 ± 0.02 mgGAE/ g) และสารสกัดหยาบเฮกเซน (0.92 ± 0.03 mgGAE/ g) ตามลำดับ

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content: TFC) โดยใช้วิธี

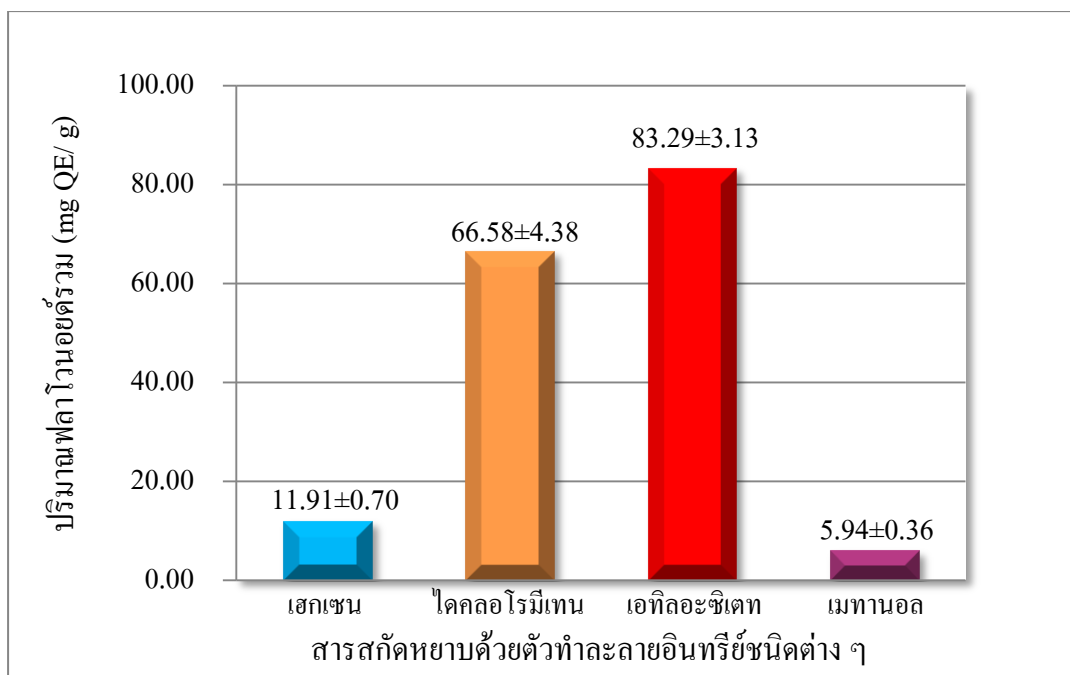
Aluminium trichloride (AlCl₃) colorimetric

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride (AlCl₃) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat, and Legret (1994) ซึ่งใช้เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่า ได้กราฟมาตรฐานสารละลายเคอร์ซีติน ดังภาพที่ 4-4 ($y = 0.0464x - 0.0012$, $R^2 = 0.9979$)



ภาพที่ 4-4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซีติน (Quercetin)

จากกราฟมาตรฐานสารละลายเคอร์ซีติน ($y = 0.0464x - 0.0012$) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋ภายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ คือ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเมทานอล ได้ผลดังภาพที่ 4-5 โดยรายงานในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (MgQE/ g)



ภาพที่ 4-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายใน
ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

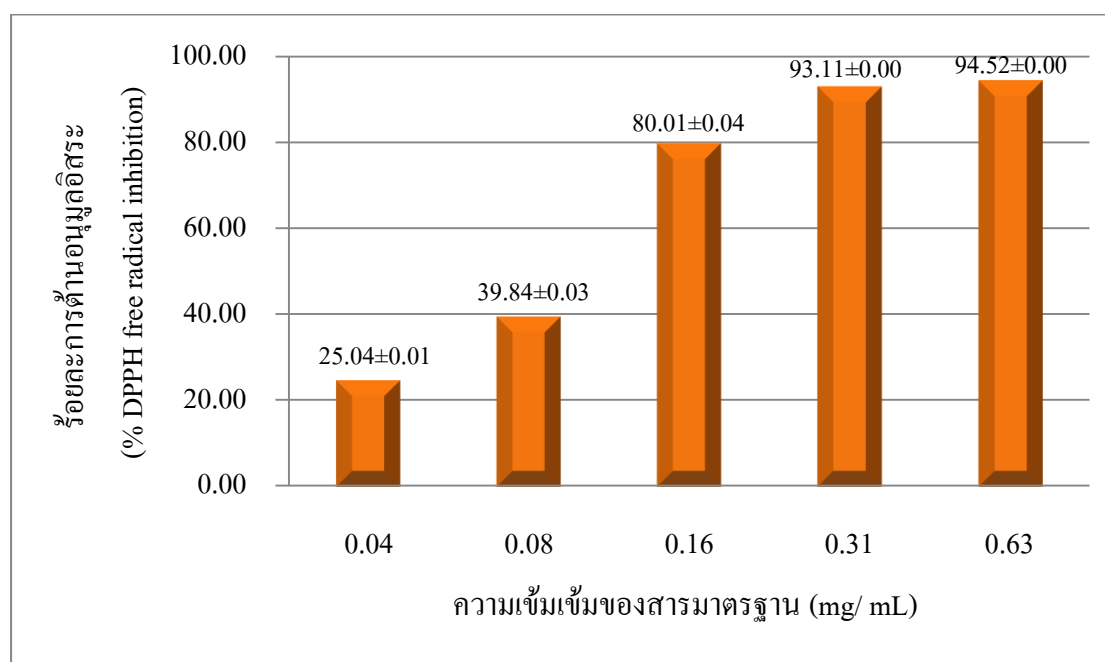
จากผลการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย
ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด
(83.29±3.13 mgQE/ g) รองลงมา คือ สารสกัดหยาบด้วยไคคลอโรมีเทน (66.58±4.38 mgQE/ g)
สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน (11.91±0.70 mgQE/ g) และสารสกัดหยาบเมทานอล (5.94±0.36
mgQE/ g) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์เบื้องต้นดังตารางที่ 4-2
ที่พบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้ทั้งในส่วนสกัดหยาบด้วยเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท
และเมทานอล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก
Braca, Sortino, Politi, Morelli, and Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็น
สารมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.04 mg/ mL
ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH radical inhibition)
ดังตารางที่ 4-3 และภาพที่ 4-6

ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ของ สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (Mg/ mL)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)
0.04	25.04±0.01
0.08	39.84±0.03
0.16	80.01±0.04
0.31	93.11±0.00
0.63	94.52±0.00



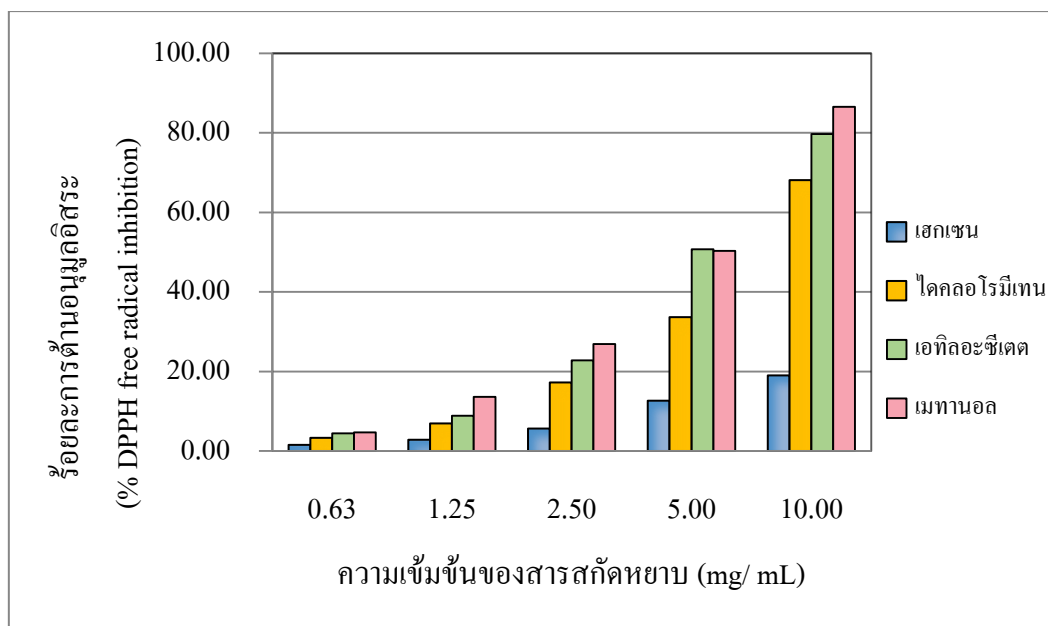
ภาพที่ 4-6 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐาน กรดแกลลิก

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วย ตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับ

สามารถฐานกรดแกลลิก พบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายทุกส่วนสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ร้อยละการยับยั้งมีค่าต่างกันซึ่งร้อยละการยับยั้งจะแปรผันตามความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้นสูงร้อยละการยับยั้งจะสูงตามด้วย จากความเข้มข้นสูงสุด คือ 10 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร สารสกัดทุกส่วนมีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ที่แสดงโดยค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เท่ากับ 86.54 ± 0.01 รองลงมาคือ สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท (ร้อยละ 79.73 ± 0.01) สารสกัดหยาบด้วยไดคลอโรมีเทน (ร้อยละ 68.11 ± 0.01) และสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน (18.97 ± 0.00) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-7

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล

ความเข้มข้นของ สารสกัดหยาบ (Mg/ mL)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)			
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล
0.63	1.50 ± 0.00	3.34 ± 0.00	4.41 ± 0.00	4.66 ± 0.01
1.25	2.86 ± 0.01	6.96 ± 0.00	8.88 ± 0.00	13.63 ± 0.01
2.50	5.63 ± 0.00	17.25 ± 0.00	22.78 ± 0.01	26.92 ± 0.01
5.00	12.63 ± 0.01	33.67 ± 0.01	50.75 ± 0.02	50.31 ± 0.01
10.00	18.97 ± 0.00	68.11 ± 0.01	79.73 ± 0.01	86.54 ± 0.01



ภาพที่ 4-7 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(%DPPH radical inhibition) ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋ช่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตดและเมทานอล

ค่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารสามารถแสดงในรูปของค่า IC_{50} ซึ่งคือค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 หากค่า IC_{50} ของสารสกัดตัวใดมีค่าต่ำแสดงว่า มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงหากค่า IC_{50} ของสารสกัดตัวใดมีค่าสูงแสดงว่า มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ โดยค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋ช่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตดและเมทานอล ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก สารสกัดหยาบจาก ส่วนเหนือดินของชิงจู๋ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลโดยวิธี DPPH radical scavenging

ค่า IC_{50} (Mg/ mL)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
กรดแกลลิก	0.105	0.095	0.092	0.0100±0.01
เฮกเซน	-	-	-	-
ไคคลอโร มีมีเทน	7.600	7.240	6.822	7.220±0.39
เอทิลอะซิเตท	5.681	5.487	5.865	5.680±0.19
เมทานอล	5.282	5.127	5.338	5.250±0.11

หมายเหตุ - หมายถึง ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าไม่ถึง 50 จึงไม่สามารถ นำมาหาค่า IC_{50} ไม่ได้

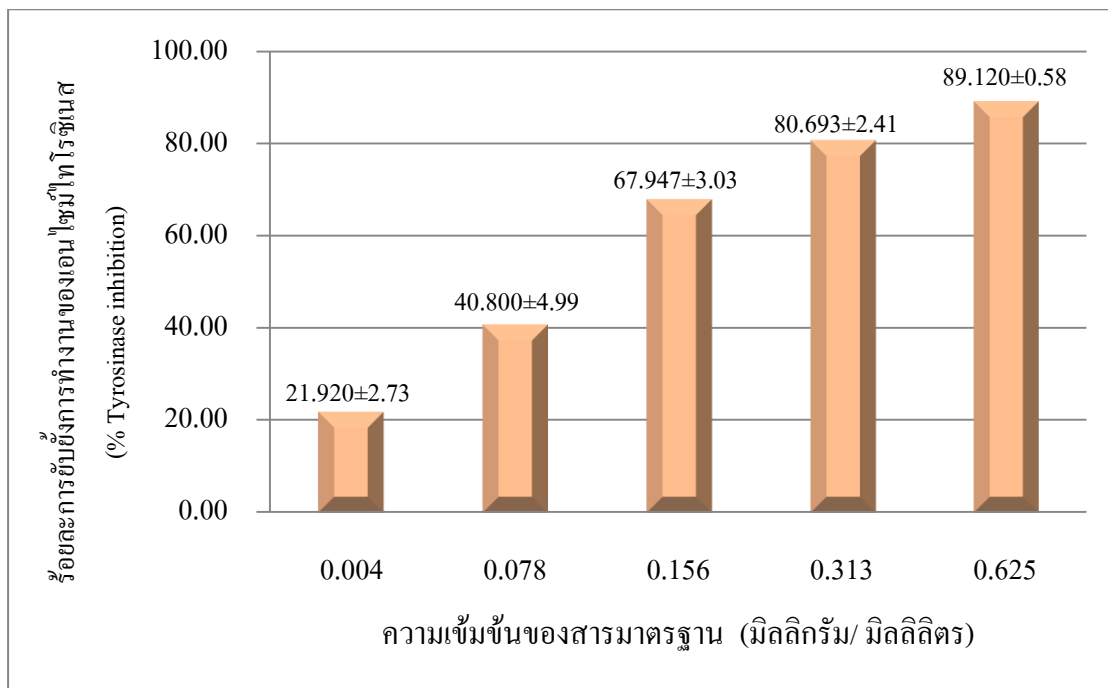
จากตารางที่ 4-5 เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิกกับสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจู๋ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล พบว่า สารสกัดหยาบจาก ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ของชิงจู๋มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในสารสกัดมีสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิดแต่มีองค์ประกอบบางชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระ

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

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธี ที่ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda, and Yonemori (2005) ใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังในตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-8

ตารางที่ 4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก
โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)
0.004	21.920±2.73
0.078	40.800±4.99
0.156	67.947±3.03
0.313	80.693±2.41
0.625	89.120±0.58



ภาพที่ 4-8 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก
โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต

ตารางที่ 4-7 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบส่วนเหนือดินของชิงจู๋น่าย ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต

สารสกัดหยาบ	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)
เฮกเซน	-8.20±1.32
ไดคลอโรมีเทน	-9.30±2.95
เอทิลอะซิเตท	-2.30±0.78
เมทานอล	9.53±4.01

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต ดังตารางที่ 4-7 พบว่า ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร สารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (9.53±4.01%)

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจู๋น่าย โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท พบว่ามีความสอดคล้องกับรายงานของ Pourmorad et al. (2006) ที่พบว่า สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย ส่วนสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมน้อยกว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทแต่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าอาจเนื่องมาจากพบสารพฤษเคมีกลุ่มคูมารินและแทนนินในสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล

ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (9.53±4.01%) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่พบสูงที่สุดเช่นเดียวกัน (86.54±0.01) ซึ่งผลดังกล่าว พบว่า สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้าง

เมล็ดสีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นั้นน่าจะเป็นผลมาจากสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งให้ผลตรงกับสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วย ตัวทำละลายเมทานอล คือ สารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และคูมาริน (Malik et al., 2011)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Agar disc diffusion

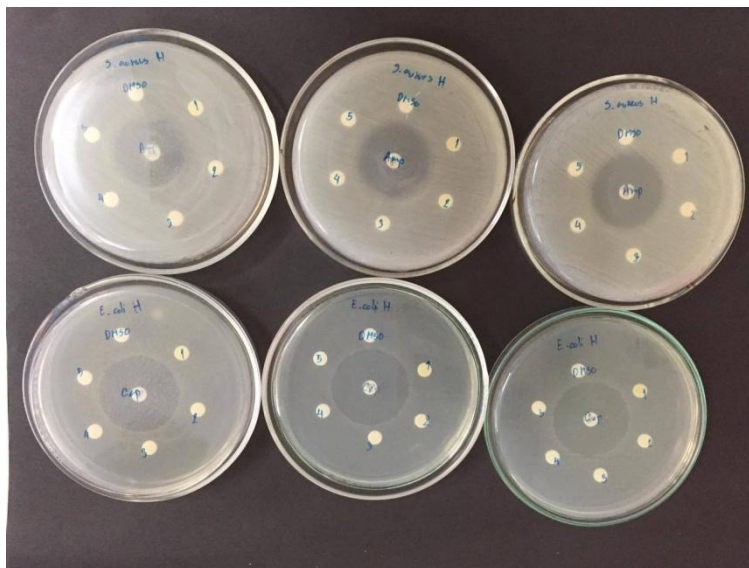
ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล แสดงดังตารางที่ 4-8 และภาพการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* แสดงดังภาพที่ 4-9 ถึง 4-12

ตารางที่ 4-8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

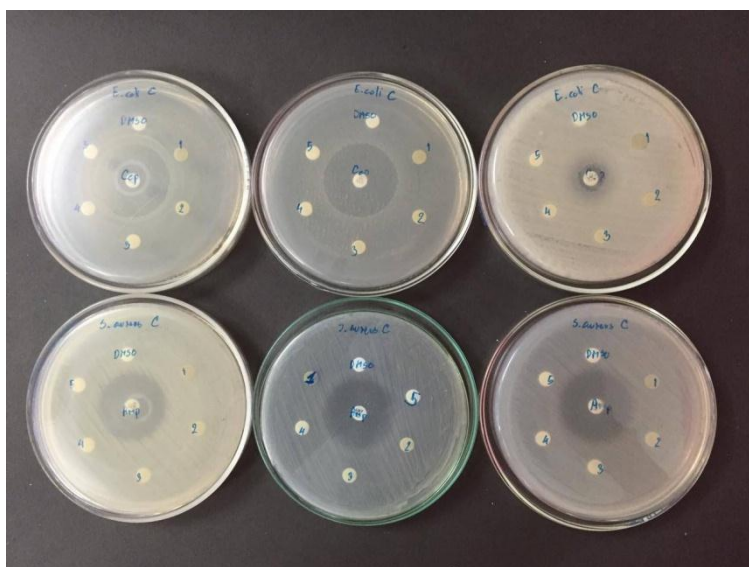
แบคทีเรีย ทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)± SD*					Ampicillin 10 mg/ disc	DMSO
	สารสกัด หยาบ เฮกเซน	สารสกัด หยาบ ไดคลอโร มีเทน	สารสกัด หยาบ เอทิลอะ ซิเตท	สารสกัด หยาบ เมทานอล			
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	25.00	-	
					±0.00		
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	20.00	-	
					±0.05		

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มี inhibition zone

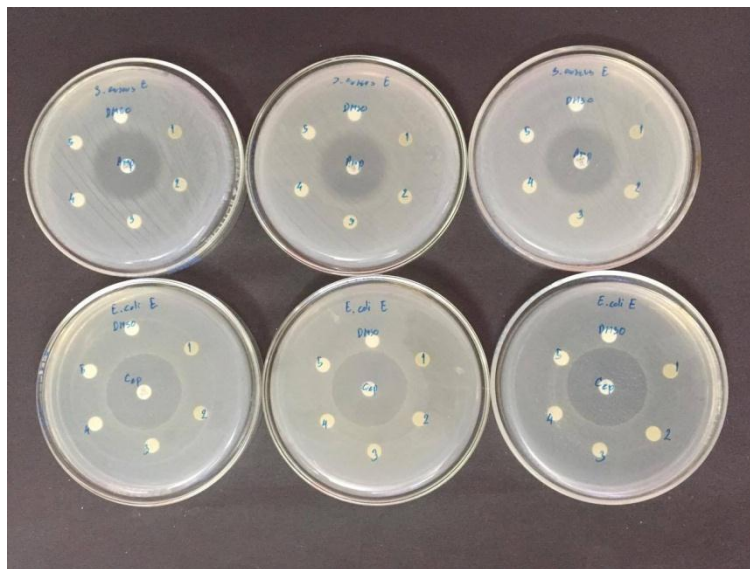
* หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง



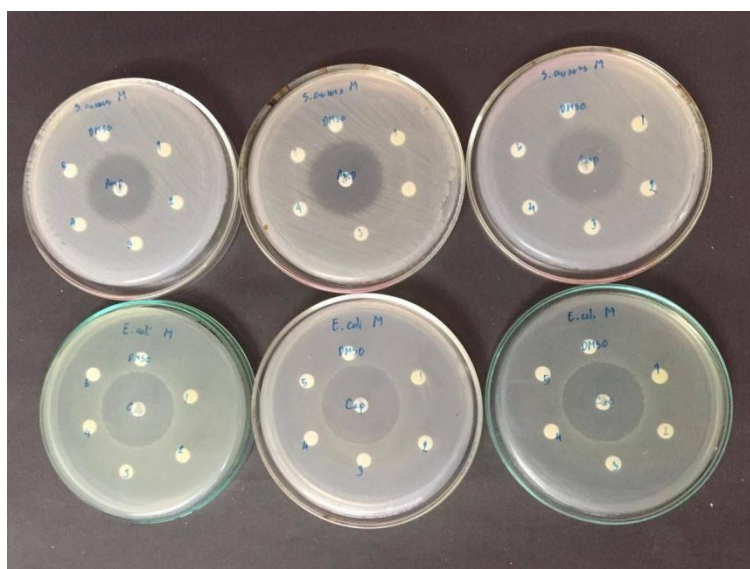
ภาพที่ 4-9 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน



ภาพที่ 4-10 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน



ภาพที่ 4-11 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋น่ายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท



ภาพที่ 4-12 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋น่ายด้วยตัวทำละลายเมทานอล

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสารพฤกษเคมี ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย จำนวนน้ำหนักแห้ง 500 กรัม ที่สกัดโดยการแช่หมักในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบร้อยละการได้กลับคืนของสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล ไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ที่ 10.12, 2.09, 1.62 และ 0.76 ตามลำดับ

การศึกษาสารพฤกษเคมีโดยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอนพบสารพฤกษเคมีทั้งหมด 7 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เทนนิน คูมาริน สเตอรอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และซาโปนิน

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทที่มีปริมาณมากที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 2.54 ± 0.02 mgGAE/ g และ 83.29 ± 3.13 mgQE/ g ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท โดยมีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 5.250 ± 0.11 และ 5.680 ± 0.19 ตามลำดับ

ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยมี L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร สารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $9.53 \pm 4.01\%$

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar disc diffusion เทียบกับสารมาตรฐาน Ampicillin และ DMSO พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีและนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี
2. ในการสกัดควรทดลองเปรียบเทียบโดยใช้พืชที่แห้งบดให้ละเอียดเทียบกับพืชสด
3. ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar Disc Diffusion สารสกัดที่ได้ อาจมีความเข้มข้นน้อยและผ่านการทำให้แห้งด้วย rotary evaporator และเก็บไว้นานจึงทำให้สารสกัดที่ได้มีความเข้มข้นเปลี่ยนไป ดังนั้นในการทดสอบครั้งต่อไปควรมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารให้มากขึ้น
4. นำสารพฤษเคมีจากจิงจูฉ่ายไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหรือเครื่องสำอางหรือประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป
5. นำไปต่อยอดการวิจัย เพื่อให้เกิดประโยชน์ที่เป็นรูปธรรมและใช้ในเชิงพาณิชย์ได้

บรรณานุกรม

- กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ. (2551). *มหาด ประโยชน์ทางยา เครื่องสำอาง และการเกษตร*. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง. (2552). *การหาปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์โดยวิธีโฟลอินเจกชันอะนาลิซิส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- จันทิมา หอมกลบ, สุพินดา วินิจฉัย, หทัยรัตน์ ริมศิริ, นคร เหลืองประเสริฐ และวิชัย หฤทัยธนาสันต์. (2553). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากผลมะขามป้อมจากแหล่งในประเทศไทย. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 (หน้า 91-99)*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จารุวรรณ ครเถื่อน, พิเชษฐ เทบ่ารุ่ง และอัมพร ภูศรีฐาน. (2554). *การสกัดและการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากเม่า (Antidesma sp.)*. สกลนคร: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานวิทยาเขตสกลนคร, เต็ม สมิตินันท์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง)*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธนากร มณีฉาย. (2556). *องค์ประกอบทางเคมีกายภาพบางประการ ปริมาณฟีนอลิกและสมบัติการต้านออกซิเดชันของน้ำอ้อยและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นิตา จุลโพธิ์. (2559). *การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์. (2557). *ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดดอกไม้มไทย: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส -2 และ -9 และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2536). *จุลชีววิทยา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21, 275-286.
- ปรียนันท์ บัวสด. (2549). การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของเครื่องคั้นชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พรรณทิพย์ นาคศรีคำ. (2558). การหาค่าประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี และสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบจากใบและเปลือกของต้นผักเหมียง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วัชรพงษ์ ทตะสังคินทร์. (2556). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเหง้าเร่วหอมและเมล็ดกระวาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วิมลลา ดีแท้. (2547). ผลของสารสกัดหยาบของไค้ไม่รู้ลืม (*Elephantopus scaber* Linn) และตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz) ต่อสมรรถภาพทางเพศในหนูขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศรินรัตน์ นัตรีธรรณันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาศ นิยมไทย. (2556). การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 41(3), 723-730.
- สุเชตร ศรีบุญเรือง. (2548). องค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากใบขนาดใหญ่และใบสามแฉ่งสามกา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- สุรางค์รัตน์ แดงจิระ. (2558). องค์ประกอบทางเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อรุณรัตน์ สันจิตติกวินสกุล. (2557). *เคมีพืชสมุนไพรท้องถิ่น*. เอกสารการสอน. นครปฐม: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardisation d'un extrait de Propolis et indentification des principaux constituants. *J. de Pharmacie de Belgique*, 49, 462-468.

- Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., & Mendez, J. (2002). Antioxidant activity of Flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 379-381.
- Brown, Micheal, R. W., & Gilbert, P. (1995). *Microbiological Quality Assurance*. Boca Raton: CRC Press.
- Collins, C. H., Lyne, M. P., & Grange, J. M. (1989). *Collins and Lyne's Microbiological Methods* (6th ed.). Oxford: Buterworth-Heinemann.
- Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1995). *Introduction to Microbiology*. Belmont, CA: Wadsworth.
- Kleyn, J., & Bicknell, M. (1999). *Microbiology Experiments: A Health Science Perspective* (2nd ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Koneman, W. E., Allen, D. S., Janda, M. W., Schreckenberger, C. P., & Washington, C. (1994). *Introduction to Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: J. B. Lippincott.
- Ma, L., Ge, F., Tang, C., Ke, C., Li, X., Althammer, A., Ye, Y. (2011). The absolute configuration determination of naturally occurring diacetylenic spiroacetal enol ethers from *Artemisia lactiflora*. *Tetrahedron*, 67, 3533-3539.
- Majhenic, L., Skerget, M., & Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104(3), 1258-1268.
- Malik, A., Kushnoor, A., Saini, V., Singhal, S., Kumar, S., Yadav, Y.C. (2011). In vitro antioxidant properties of scopoletin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(3), 659-665.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry*, 69, 197-201.
- Mckane, L., & Kandel, J. (1996). *Microbiology* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.
- Nester, E. W., Evans, C. R., & Martha, T. N. (1995). *Microbiology*. Dudugue: Wm. C. Brown.
- Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A., Jiwajinda, S., & Ohigashi, H. (1998). Isolation and identification of acetylenic spiroketal enol ethers from *Artemisia lactiflora* as inhibitors of superoxide generation induced by a tumor promoter in differentiated

- HL-60 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5031–5036.
- Pelezar, M. J. (1958). *Laboratory Exercises in Microbiology* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and Flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
- Tortora, G. J., Berdell, R. F., & Christine, L. C. (1995). *Microbiology* (5th ed.). California: Benjamin/ Cummings.
- Xiao, M.-T., Luo, D.W., Ke, Z., Ye, J., & Tu, P.-F. (2014). A novel polyacetylene from the aerial parts of *Artemisia lactiflora*. *Phytochemistry Letters*, 8, 52-54.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ภาพส่วนต่าง ๆ ของจิงจู๋น่าย



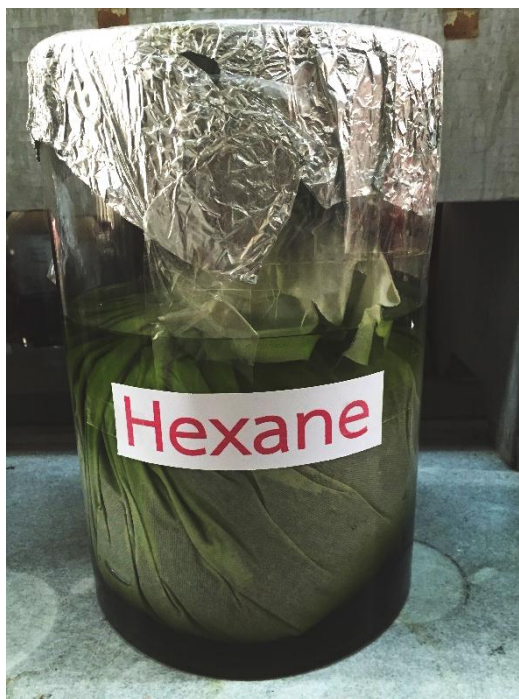
ภาพภาคผนวกที่ ก-1 ต้นจิงจูฉ่าย



ภาพภาคผนวกที่ ก-2 ใบจิงจูฉ่าย

ภาคผนวก ข

ภาพการสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย โดยวิธีแช่ด้วยตัวทำละลาย



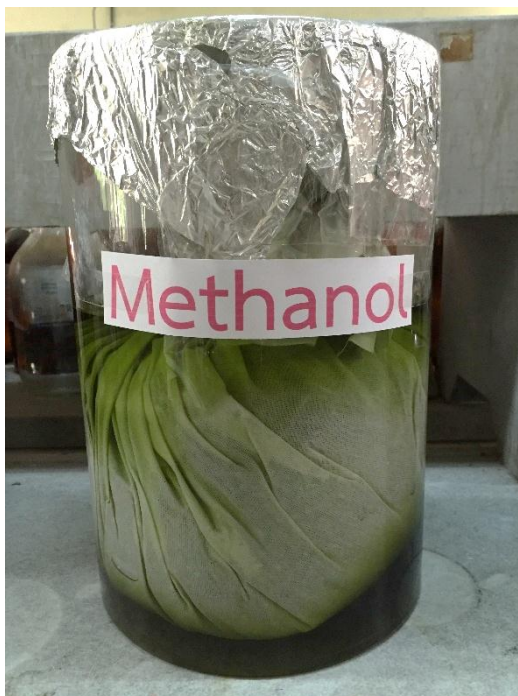
ภาพภาคผนวกที่ ข-1 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน



ภาพภาคผนวกที่ ข-2 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน



ภาพภาคผนวกที่ ข-3 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท



ภาพภาคผนวกที่ ข-4 การสกัดส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเมทานอล

ภาคผนวก ค
วิธีการคำนวณต่าง ๆ

1. การคำนวณร้อยละผลผลิต (% yield)

จากสูตร $\%yield = (\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ} / \text{น้ำหนักตัวอย่าง}) \times 100$

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

น้ำหนักของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน = 8.10 กรัม

น้ำหนักของส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย = 500.00 กรัม

แทนค่า $\%yield = (\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ} / \text{น้ำหนักตัวอย่าง}) \times 100$

$\%yield = (8.10 / 500.00) \times 100$

$\%yield = 1.62$

สารสกัดหยาบส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมี $\%yield = 1.62$

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 น้ำหนักของส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายแห้ง น้ำหนักสารสกัดหยาบ และร้อยละผลผลิต

สารสกัดหยาบจาก ส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	น้ำหนักของส่วนเหนือดิน ของจิงจูฉ่ายแห้ง (กรัม)	น้ำหนัก สารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละ ผลผลิต (% yield)
สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน	500.00	8.10	1.62
สารสกัดหยาบด้วยไดคลอโรมีเทน	500.00	10.45	2.09
สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท	500.00	3.79	0.76
สารสกัดหยาบด้วยเมทานอล	500.00	50.61	10.12

2. การเตรียมสาร การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การเตรียมสาร

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

2. สารละลาย Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ในเอทานอล โดยชั่ง

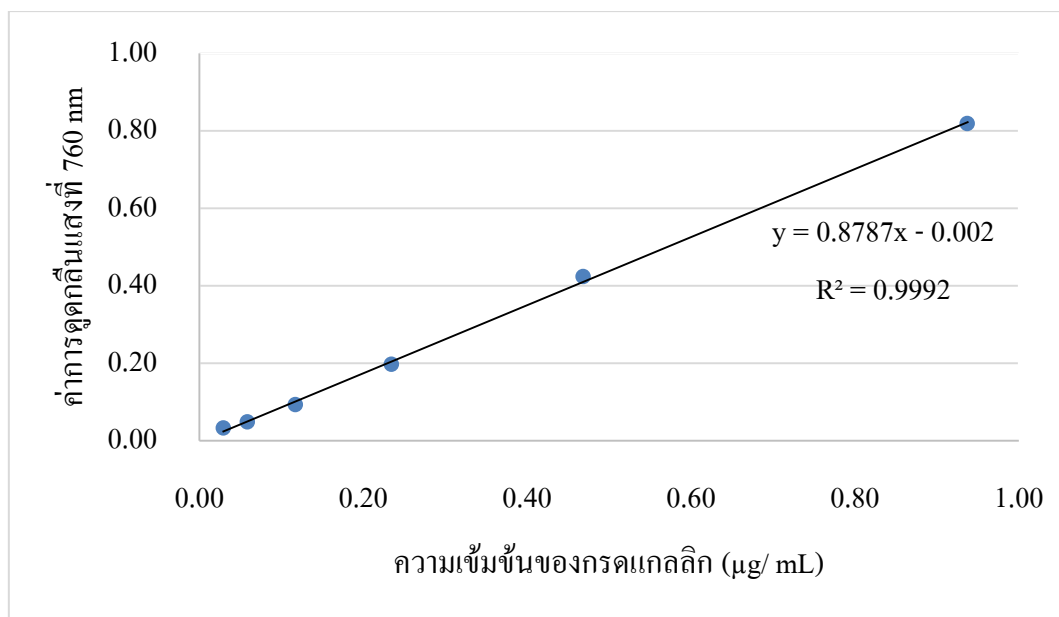
กรดแกลลิก 0.025 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 25.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 75.000-0.146 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

3. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยมวล/ ปริมาตร โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 1.250 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

4. สารละลายตัวอย่างในตัวทำละลายเอทานอล เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร โดยชั่งสารตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm

ตารางภาคผนวกที่ ก-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานกรดแกลลิก ($\mu\text{g/ mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร			เฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0.938	0.776	0.856	0.822	0.818
0.469	0.426	0.410	0.433	0.423
0.234	0.186	0.199	0.205	0.197
0.117	0.091	0.101	0.085	0.092
0.059	0.046	0.048	0.049	0.048
0.029	0.034	0.033	0.030	0.032



ภาพภาคผนวกที่ ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ได้สมการ $y = 0.8787x - 0.002$, $R^2 = 0.9992$

ตารางภาคผนวกที่ ค-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ ฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัว ทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

สารสกัดหยาบจาก ส่วนเหนือดินของ จิงจูฉ่าย	ความเข้มข้น		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร		
	เริ่มต้น (Mg/ mL)	สุดท้าย (Mg/ mL)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เฮกเซน	5.000	0.500	0.411	0.387	0.404
ไคคลอโรมีเทน	0.630	0.063	0.062	0.064	0.063
เอทิลอะซิเตท	0.630	0.063	0.137	0.138	0.138
เมทานอล	2.500	0.250	0.310	0.312	0.306

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย ในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (MgGAE/ g) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างเช่น การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน

ค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 1 ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน เท่ากับ 0.411

$$\text{จากสมการ} \quad y = 0.8787x - 0.002$$

$$\text{แทนค่า} \quad y = 0.411$$

$$0.411 = 0.8787x + 0.002$$

$$x = 0.465$$

ดังนั้นสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซนความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมเท่ากับ 0.465 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร หรือ 0.000465 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วย mgGAE/ g

สารสกัดตัวอย่าง 0.50 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก 0.000465 mg/ mL

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก

$$\frac{0.000465 \text{ mg/ mL} \times 1,000 \text{ mg}}{0.50 \text{ mg}} = 0.93 \text{ mgGAE/ g}$$

$$0.50 \text{ mg}$$

ดังนั้น สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.93 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม

ตารางภาคผนวกที่ ค-4 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดหยาบจากส่วน
เหนือดินของชิงจู๋ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคโลโรมีเทน
เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (Mg/ mL)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (MgGA/ g)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
เฮกเซน	0.50	0.94	0.94	0.89	0.92	0.03
ไคคโลโรมีเทน	0.0625	1.18	1.17	1.20	1.18	0.02
เอทิลอะซิเตท	0.0625	2.55	2.53	2.55	2.54	0.01
เมทานอล	0.25	1.35	1.42	1.43	1.40	0.04

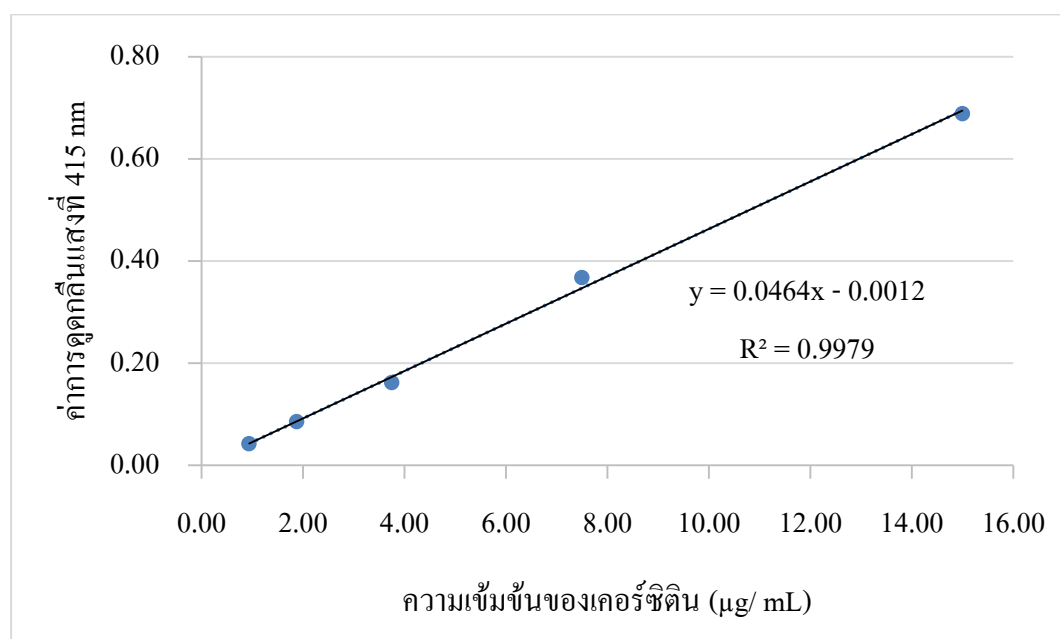
3. การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 2.00 โดยมวล/ ปริมาตร ในตัวทำละลายเมทานอล
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (Quercetin) ความเข้มข้น 0.10 mg/ mL ในเมทานอล โดยชั่ง Quercetin 0.10 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร จากนั้น เจือจางให้มีความเข้มข้น 150.000-0.293 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 50.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ในตัวทำละลายเมทานอล โดยชั่งสารตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย $AlCl_3$ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm

ตารางภาคผนวกที่ ค-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน
(Quercetin)

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานเคอร์ซีติน ($\mu\text{g/ mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร			เฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
1.500	0.692	0.681	0.690	0.688
0.750	0.374	0.373	0.353	0.367
0.375	0.162	0.157	0.164	0.161
0.188	0.082	0.089	0.084	0.085
0.094	0.043	0.040	0.042	0.042



ภาพภาคผนวกที่ ค-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm กับ
ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน

กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซีติน ได้สมการ $y = 0.0464x - 0.0012$, $R^2 = 0.9979$

ตารางภาคผนวกที่ ค-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ
 ฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจู๋น่าย
 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

สารสกัดหยาบจาก ส่วนเหนือดิน ของชิงจู๋น่าย	ความเข้มข้น		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร		
	เริ่มต้น	สุดท้าย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
	(Mg/ mL)	(Mg/ mL)			
เฮกเซน	2.250	0.250	0.129	0.145	0.137
ไคคลอโรมีเทน	0.310	0.031	0.099	0.088	0.099
เอทิลอะซิเตท	0.630	0.063	0.230	0.247	0.244
เมทานอล	2.500	0.250	0.069	0.071	0.063

วิธีการการคำนวณ

หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของชิงจู๋น่ายใน
 หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (MgQE/ g) โดยการนำค่า
 การดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน
 ค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 1 ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน เท่ากับ 0.129

$$\text{จากสมการ } y = 0.0464x - 0.0012$$

$$\text{แทนค่า } y = 0.129$$

$$0.129 = 0.0464x - 0.0012$$

$$x = 2.806$$

ดังนั้น สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน ความเข้มข้น 0.250 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร มีปริมาณ
 สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 2.806 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร หรือ 0.0028 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วย mgQE/ g

สารสกัดตัวอย่าง 0.250 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก 0.0028 mgQE

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก

$$\frac{0.0028 \text{ mgQE} \times 1,000 \text{ mg}}{0.250 \text{ mg}} = 11.200 \text{ mgQE/ g}$$

$$0.250 \text{ mg}$$

ดังนั้น สารสกัดหยาบด้วยเฮกเซนจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 11.200 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม

ตารางภาคผนวกที่ ค-7 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ของ

สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน
ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (Mg/ mL)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (MgQE/ g)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
เฮกเซน	0.250	11.198	12.603	11.914	11.905	0.70
ไดคลอโรมีเทน	0.031	69.103	61.517	69.103	66.575	4.38
เอทิลอะซิเตท	0.063	79.724	85.586	84.552	83.287	3.13
เมทานอล	0.250	6.052	6.224	5.534	5.937	0.36

4. การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

การเตรียมสาร

1. สารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ (20 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) โดยชั่ง DPPH 10 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 500 มิลลิลิตร

2. สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอล โดยชั่งสารมาตรฐานกรดแกลลิก 2 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.625 - 0.039 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร

3. สารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 10.000-0.625 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.625 - 0.039 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้น 10.000 - 0.625 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรกับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น

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

คำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

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

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณหาอัตราการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน

(A) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.710

(B) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ความเข้มข้น 10.000 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.572

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

$$\text{แทนค่า เมื่อ } A = 0.710$$

$$B = 0.572$$

$$\%DPPH \text{ radical inhibition} = [(0.710-0.572)/ 0.710] \times 100$$

$$\%DPPH \text{ radical inhibition} = 19.44$$

สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 10.000 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ครั้งที่ 1 มีร้อยละ การต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 19.44 นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่คำนวณได้ ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) แสดงดังตาราง ภาคผนวกที่ ค-8 และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋ช่ายด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ค-9 ถึงตารางภาคผนวกที่ ค-12

ตารางภาพผนวกที่ ค-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

ความเข้มข้นของ กรดแกลลิก (Mg/ mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 นาโนเมตร			%DPPH free radical inhibition				SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.04	0.513	0.507	0.525	25.328	26.201	23.581	25.0364	0.01
0.08	0.442	0.409	0.389	35.662	40.466	43.377	39.8350	0.03
0.16	0.175	0.132	0.105	74.527	80.786	84.716	80.0097	0.04
0.31	0.050	0.046	0.044	92.722	93.304	93.304	93.1101	0.00
0.63	0.039	0.039	0.035	94.323	94.323	94.905	94.5172	0.00

ตารางภาพผนวกที่ ค-9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋ช่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ความเข้มข้นของ สารสกัดหยาบ (Mg/ mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 นาโนเมตร			%DPPH free radical inhibition				SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.63	0.699	0.703	0.696	1.549	0.986	1.972	1.502	0.00
1.25	0.675	0.695	0.699	4.930	2.113	1.549	2.864	0.01
2.50	0.668	0.667	0.675	5.915	6.056	4.930	5.634	0.00
5.00	0.620	0.624	0.617	12.676	12.113	13.099	12.629	0.00
10.00	0.572	0.570	0.584	19.437	19.718	17.746	18.967	0.00

ตารางภาพผนวกที่ ค-10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ความเข้มข้นของ สารสกัดหยาบ (Mg/ mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 นาโนเมตร			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
	0.63	0.577	0.582	0.578	3.673	2.838	3.506	3.339
1.25	0.557	0.559	0.556	7.012	6.678	7.179	6.956	0.00
2.50	0.496	0.492	0.499	17.195	17.863	16.694	17.251	0.00
5.00	0.408	0.387	0.397	31.886	35.392	33.723	33.667	0.01
10.00	0.203	0.190	0.180	66.110	68.280	69.950	68.114	0.01

ตารางภาพผนวกที่ ค-11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต

ความเข้มข้นของ สารสกัดหยาบ (Mg/ mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 นาโนเมตร			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
	0.63	0.571	0.570	0.571	4.355	4.523	4.355	4.411
1.25	0.541	0.547	0.544	9.380	8.375	8.878	8.878	0.00
2.50	0.460	0.452	0.471	22.948	24.288	21.106	22.781	0.01
5.00	0.289	0.276	0.317	51.591	53.769	46.901	50.754	0.02
10.00	0.127	0.124	0.112	78.727	79.229	81.240	79.732	0.01

ตารางภาคผนวกที่ ค-12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจู๋ช่ายด้วยตัวทำละลายเมทานอล

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (Mg/ mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.63	0.550	0.560	0.569	6.303	4.600	3.066	4.656	0.01
1.25	0.512	0.515	0.494	12.777	12.266	15.843	13.629	0.01
2.50	0.434	0.424	0.429	26.065	27.768	26.917	26.917	0.01
5.00	0.289	0.287	0.299	50.767	51.107	49.063	50.312	0.01
10.00	0.081	0.071	0.085	86.201	87.905	85.520	86.542	0.01

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

การเตรียมสาร

- การเตรียม phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 20 mM โดยผสมสารดังต่อไปนี้
 - เตรียมสารละลาย A: สารละลายโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (Mono basic sodium phosphate, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.20 M โดยชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 3.1202 g (MW=156.01 g/ mol) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL
 - เตรียมสารละลาย B: สารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.2 M โดยชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 5.3614 g (MW=177.99 g/ mol) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL
 - นำสารละลาย A ปริมาตร 51.00 mL และสารละลาย B ปริมาตร 49.00 mL มาผสมกัน วัด pH ให้ได้ 6.8 ถ้าไม่ได้ให้ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl เมื่อได้ pH เท่ากับ 6.8 แล้ว ให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 mL จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 mM
- เอนไซม์ Tyrosinase ละลายใน phosphate buffer ความเข้มข้น 400 U/ mL
- สารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น เริ่มต้น 1.00 mg/ mL (สารมาตรฐานกรดโคจิก 1.00 mg/ mL: ชั่งกรดโคจิก 1.00 mg ละลายในเมทานอล

1 mL แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 0.625-0.039 mg/ mL)

4. สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 3.00 mM ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 (ซึ่ง L-DOPA 5.9 mg ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 10.0 mL)

5. สารละลายตัวอย่างในตัวทำละลาย 80%เมทานอล ความเข้มข้น 10.00-0.625 mg/ mL (เตรียมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 50.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 10.00-0.625 mg/ mL)

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.625-0.039 mg/ mL) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้น 10.00-0.625 mg/ mL) ปริมาตร 20.0 μ L กับสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 120.0 μ L และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 400 U/ mL ใน Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 20.0 μ L ลงในจานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 3.0 mM ปริมาตร 40.0 μ L ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็น เวลา 10 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader

ตารางภาคผนวกที่ ก-13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

ความเข้มข้น ของกรดโคจิก (Mg/ mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition				SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.004	0.474	0.507	0.483	24.160	18.880	22.720	21.920	2.73
0.078	0.366	0.403	0.341	41.440	35.520	45.440	40.800	4.99
0.313	0.207	0.179	0.215	66.880	71.360	65.600	67.947	3.03
0.156	0.138	0.111	0.113	77.920	82.240	81.920	80.693	2.41
0.625	0.071	0.069	0.064	88.640	88.960	89.760	89.120	0.58

ตารางภาคผนวกที่ ค-14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของ
เอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วย
ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร
โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต

สารสกัดหยาบ (Mg/ mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition				SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
เฮกเซน	0.708	0.698	0.691	-9.598	-8.050	-6.966	-8.204	1.32
ไดคลอโรมีเทน	0.692	0.67	0.707	-9.667	-6.181	-12.044	-9.297	2.95
เอทิลอะซีเตท	0.553	0.642	0.649	12.361	-1.743	-2.853	-2.300	0.78
เมทานอล	0.602	0.558	0.558	4.897	11.848	11.848	9.531	4.01

ตัวอย่าง การคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยมี L-DOPA เป็น ซับสเตรต ที่ความเข้มข้น 10.00 mg/ mL

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

แทนค่า เมื่อ $A = 0.646$

$B = 0.708$

$\%Tyrosinase\ inhibition = [(0.646-0.708)/ 0.646] \times 100$

$\%Tyrosinase\ inhibition = -9.598$

สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย ที่ความเข้มข้น 10.00 mg/ mL ครั้งที่ 1 มีค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ -9.598

ภาคผนวก ง
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

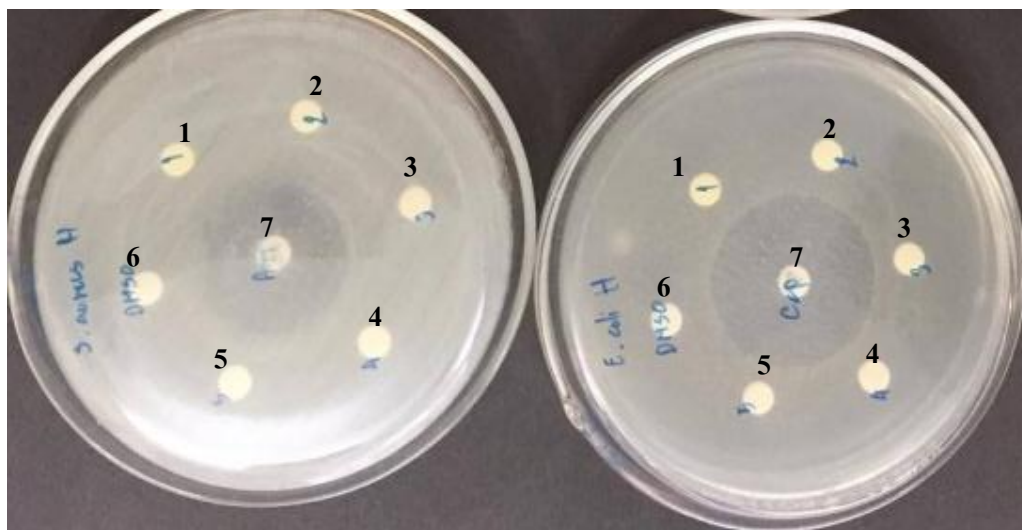
การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

1. เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อโคโลนีของเชื้อทดสอบประมาณ 5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง
3. ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรและทำการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีการ drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion

1. ละลายสารสกัดจากต้นจิงจูฉ่ายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารสกัดจิงจูฉ่ายลงในดิสก์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์) และหยด DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายลงในดิสก์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Negative control) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที
2. ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่เตรียมไว้ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) ให้ทั่ว (อาหาร MHA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) โดยป้ายในแนว 3 ระบาย ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที และใช้ปากคีบปราศจากเชื้อหยิบแผ่นดิสก์ที่บรรจุสารทดสอบ (Paper disc) คือ ดิสก์ยา tetracycline ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Positive control) และดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Negative control) วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่าย



Staphylococcus aureus

Escherichia coli

ภาพภาคผนวกที่ ง-1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของจิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

หมายเลข 1: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 10.00 mg/ mL

หมายเลข 2: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 5.00 mg/ mL

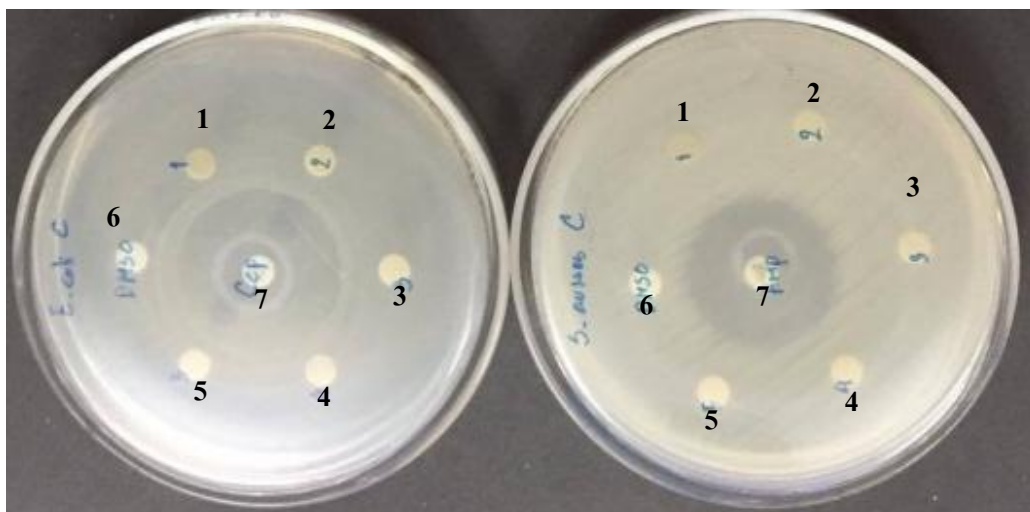
หมายเลข 3: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 2.50 mg/ mL

หมายเลข 4: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 1.25 mg/ mL

หมายเลข 5: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 0.625 mg/ mL

หมายเลข 6: ดิสก์บรจุ DMSO (Negative control)

หมายเลข 7: ดิสก์ยา Ampicillin 10 mg/ disc (Positive control)

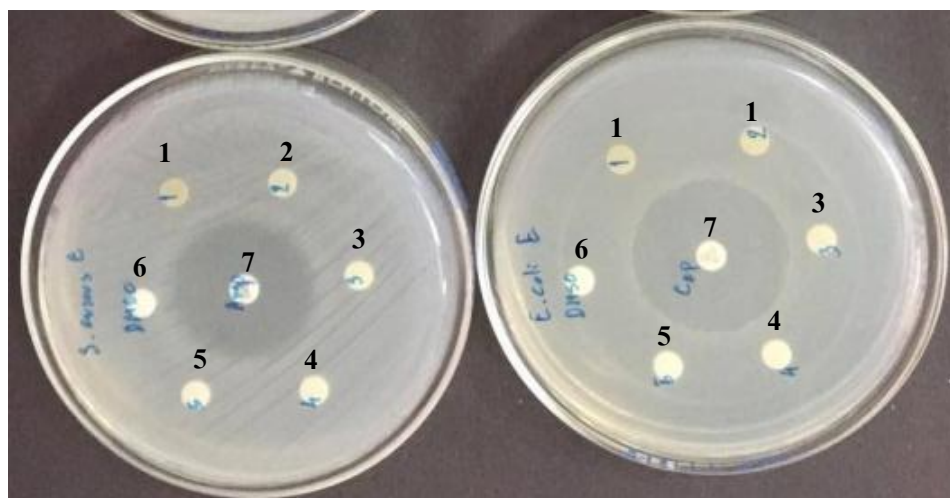


Escherichia coli

Staphylococcus aureus

ภาพภาคผนวกที่ ง-2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของ จิงจูฉ่ายด้วยตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน

- หมายเลข 1: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน 10.00 mg/ mL
 หมายเลข 2: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน 5.00 mg/ mL
 หมายเลข 3: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน 2.50 mg/ mL
 หมายเลข 4: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน 1.25 mg/ mL
 หมายเลข 5: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน 0.625 mg/ mL
 หมายเลข 6: ดิสก์บรจุ DMSO (Negative control)
 หมายเลข 7: ดิสก์ยา Ampicillin 10 mg/ disc (Positive control)



Staphylococcus aureus

Escherichia coli

ภาพภาคผนวกที่ ง-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของ จิงจู๋น่ายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท

หมายเลข 1: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 10.00 mg/ mL

หมายเลข 2: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 5.00 mg/ mL

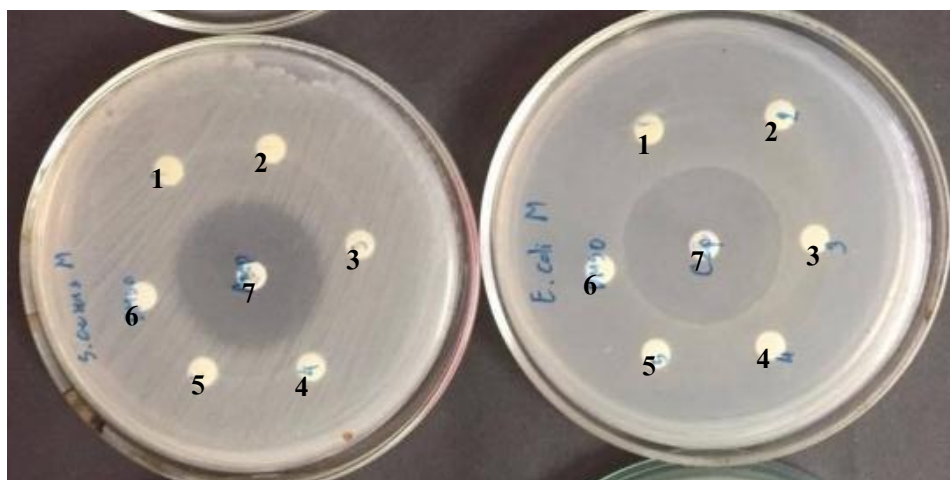
หมายเลข 3: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 2.50 mg/ mL

หมายเลข 4: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 1.25 mg/ mL

หมายเลข 5: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 0.625 mg/ mL

หมายเลข 6: ดิสก์บรจุ DMSO (Negative control)

หมายเลข 7: ดิสก์ยา Ampicillin 10 mg/ disc (Positive control)



Staphylococcus aureus

Escherichia coli

ภาพภาคผนวกที่ ง-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของ จิงจู๋น่ายด้วยตัวทำละลายเมทานอล

หมายเลข 1: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอล 10.00 mg/ mL

หมายเลข 2: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอล 5.00 mg/ mL

หมายเลข 3: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอล 2.50 mg/ mL

หมายเลข 4: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอล 1.25 mg/ mL

หมายเลข 5: สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอล 0.625 mg/ mL

หมายเลข 6: ดิสก์บรจุ DMSO (Negative control)

หมายเลข 7: ดิสก์ยา Ampicillin 10 mg/ disc (Positive control)