รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

Antioxidant and Antibacterial Activities from the Extracts of *Quisqualis indica* Linn.

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุภัทร ตางาม

นางสาวดวงสุรีย์ แสนสีระ

นายบุญชัย ด้วงสวัสดิ์

นายสุรวิทย์ นันทการัตน์

นางสาวอนัญญา ไทยบุญนาค

นางสาวสุวรรณา รุ่งเรือง

โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณผลประโยชน์ ปี พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

Antioxidant and Antibacterial Activities from the Extracts
of *Quisqualis indica* Linn.

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุภัทร ตางาม

นางสาวดวงสุรีย์ แสนสีระ

นายบุญชัย ด้วงสวัสดิ์

นายสุรวิทย์ นันทการัตน์

นางสาวอนัญญา ไทยบุญนาค

นางสาวสุวรรณา รุ่งเรือง

โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณผลประโยชน์ ปี พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณผลประโยชน์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ซึ่งสามารถสำเร็จได้ด้วยความร่วมมือจากผู้ร่วมวิจัยในกลุ่ม นักศึกษาปัจจุบัน ที่ช่วยเหลือในขั้นตอนการทดลองและทดสอบในการวิจัย อาจารย์สาโรช เจริญศักดิ์ สาขาวิชาชีววิทยา และ ดร.พิชามญชุ์ น้อยสุวรรณ หัวหน้าสาขาวิชาชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พลวัต นิวเคลียร์ พี่เลี้ยงนักวิจัยที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านระเบียบวิธีวิจัยที่ใช้ในการวิจัย ตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่คณะผู้วิจัยไว้ ณ โอกาสนี้ด้วยคุณประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญุตาแด่ มารดา บิดา บูรพาจารย์ของคณะผู้วิจัย และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ภาณุภัทร ตางาม และคณะผู้ร่วมวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

ชื่อเรื่อง : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

ชื่อผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุภัทร ตางาม และคณะผู้ร่วมวิจัย

ปี พ.ศ. : 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง โดยการนำส่วนดอก และส่วนใบกับก้านของต้นเล็บมือนางมาทำแห้ง บด และสกัดด้วยวิธีการหมักโดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ เอทานอล และเมธานอล ศึกษาร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า ร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอกให้ปริมาณสูงสุดเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลเท่ากับร้อยละ 8.68 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางโดยวิธี ABTS พบว่า สารสกัดเมทานอลเล็บมือนางส่วนดอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS มากที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางโดยวิธีวัดปริมาณความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรีย พบว่า สารสกัดเฮกเซนเล็บมือนางส่วนดอกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *B.cereus* ดีที่สุด คิดเป็นร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเท่ากับ 56.36.

Title : Antioxidant and Antibacterial Activities from the Extracts of *Quisqualis indica* Linn.

Author : Asst. Prof. Panupat Tangam**,** et al.

Year : 2018

Abstract

In this research work, antioxidant activity and antibacterial activities of the extracts from *Quisqualis indica* Linn. were studied. The flower and the leaves with stems of *Q. indica* L. were dried, ground and macerated with hexane, chloroform, diethyl ether, ethanol and methanol, sequentially. The % yield, antioxidant activity and antibacterial activities of the crude extracts and this plant were investigated. The flower methanolic extract of *Q. indica* L. presented the highest % yield with 8.68 %. The antioxidant activity of the crude extracts were determined by ABTS methods. The flower methanolic extract of *Q. indica* L. exhibited the highest antioxidant activity (ABTS) with an IC_{50} of 5.09 mg mL^{-1}.

The antibacterial activities of the crude extracts were determined by optical density microplate assay(OD_{600}) methods (test with three bacterial as *Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*). The flower hexane extract of *Q. indica* L. showed the highest antibacterial activity against *B.cereus* with % inhibition values 56.36 %.

คำนำ

รายงานการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ทางยา โดยนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์เพื่อการศึกษาเรียนรู้ การพัฒนางานวิจัย เป็นข้อมูลทางคลินิกวิทยา ตลอดจนนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรทั้งในระดับชุมชน ในระดับอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ และเป็นแนวทางในการวิจัยระดับต่อไป ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้คงจะเป็นประโยชน์ต่อมหาวิทยาลัย นักวิจัย นักศึกษา และผู้ที่สนใจ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เพราะสถาบันวิจัยและพัฒนา และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพให้โอกาส และสนับสนุนเงินทุนวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุภัทร ตางาม และคณะผู้ร่วมวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ข
บทคัดย่อภาษาไทย		ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ง
คำนำ		จ
สารบัญ		ฉ
สารบัญตาราง		ซ
สารบัญภาพ		ฌ
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาโครงการ	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
	1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
	1.4 สมมติฐานของโครงการวิจัย	2
	1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย	3
	1.6 นิยามศัพท์	4
	1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2	ทฤษฎี แนวคิด และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	2.1 เล็บมือนาง	5
	2.2 อนุมูลอิสระ	7
	2.3 สารต้านออกซิเดชัน	12
	2.4 สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ	12
	2.5 สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์	16
	2.6 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	19
	2.7 ตัวทำละลาย	19
	2.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical	22
	2.9 ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์(UV-VIS Spectrophotometer)	24
	2.10 *Bacillus cereus*	25
	2.11 *Escherichia coli*	27

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.12 *Pseudomonas aeruginosa* 28
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 29
3 วิธีดำเนินงานวิจัย 31
3.1 ตัวอย่างที่ทำการศึกษา 31
3.2 เครื่องมือ และสารเคมี 31
3.3 วิธีดำเนินงาน 32
3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant Activity) 32
3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง 33
4. ผลการทดลอง 36
4.1 ลักษณะทางกายภาพของเล็บมือนาง 36
4.2 ร้อยละของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง 37
4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางด้วยสาร ABTS 38
4.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง 39
5 สรุปผล อภิปรายผลโครงการวิจัย และข้อเสนอแนะ 51
5.1 สรุปผลการศึกษา 51
5.2 อภิปรายผลโครงการ 53
5.3 ข้อเสนอแนะ 53
บรรณานุกรม 58
ภาคผนวก 58
ภาคผนวก ก 59
ภาคผนวก ข 60
ประวัติผู้เขียน 63

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	อนุมูลอิสระ และสารที่เกี่ยวข้อง	8
4.1	ร้อยละของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง(% yield)(w/w)	37
4.2	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางแห้งด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล ไดเอทิล อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน	39
4.3	แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus cereus*สายพันธุ์ ATCC11778 (TISTR) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้าน ในตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล ไดเอทิล อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน	41
4.4	แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01(ATCC15692) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลาย เอทานอล เมทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน	44
4.5	แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC25922 ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	เล็บมือนาง	22
2.2	โครงสร้างทางเคมี (ก.) อัลฟ่า - แคโรทีน(α-carotene) และ (ข.) เบต้า – แคโรทีน (β-carotene)	14
2.3	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลลิกชนิดต่าง ๆ	16
2.4	โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid	17
2.5	โครงสร้างทางเคมีของ EDTA	17
2.6	โครงสร้างทางเคมีของ EDTA จับกับไอออนของโลหะ	18
2.7	โครงสร้างทางเคมีของโทรลอกซ์	18
2.8	การจัดตั้งอุปกรณ์การสกัดของแข็งด้วยของเหลว	19
2.9	การจัดตั้งอุปกรณ์การสกัดของเหลวด้วยของเหลว	20
2.10	เครื่องการกลั่นแบบระเหยสารแบบหมุนโรตารี อีวาโปเรเตอร์	21
2.11	โครงสร้างทางเคมีของ ABTS	24
2.12	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ ABTS [2, 2 - azino – bis (3 - ethylbenzthiazoline - 6 - sulphonic acid)]	24
2.13	*Bacillus cereus* (Spore Forming Bacteria)	26
2.14	*Escherichia coli*	27
2.15	การย้อมแกรมของ *Pseudomonas aeruginosa* (รูปแท่งสีแดงอมชมพู)	28
3.1	เล็บมือนาง	31
4.1	สารสกัดหยาบเล็บมือนางที่ได้จากการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 93	36
4.2	สารสกัดหยาบเล็บมือนางที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศ	36
4.3	แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยวิธี ABTS assay	38
6.1	ดอกเล็บมือนาง	60
6.2	ใบกับก้านอ่อนเล็บมือนาง	60
6.3	ดอกเล็บมือนางปั่นแห้ง	61
6.4	ใบกับก้านอ่อนเล็บมือนางปั่นแห้ง	61
6.5	ชั่งดอกที่ปั่นละเอียดบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ปริมาณขวดละ 25 กรัม ต่อตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร	62

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

6.6 ชั่งใบกับก้านอ่อนที่ปั่นละเอียดบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ปริมาณขวดละ 25 กรัม ต่อตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร 62

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาโครงการ

เล็บมือนาง *Quisqualis indica* Linn. เป็นพืชไม้เลื้อย จัดอยู่ในวงศ์ Combretaceae ดอกมีลักษณะเป็นช่อ มีสีแดงอมขาว หรือสีชมพู มีกลิ่นหอม ผลสีน้ำตาลแดงเป็นมัน มี 5 พู ถิ่นกำเนิดของเล็บมือนางอยู่บริเวณเอเชียใต้จนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้(เต็ม, 2549) ประโยชน์ของเล็บมือนางคือเป็นไม้ดอกที่งดงามและมีกลิ่นหอม ปลูกง่าย ทนทานอยู่ได้นาน ไม่ต้องดูแลรักษามาก ออกดอกได้ตลอดปี คนไทยนิยมนำมาปลูกให้เลื้อยเป็นซุ้มอยู่ตามประตู ตามรั้ว หรือขึ้นร้านเป็นหลังคาที่นั่งพักผ่อน ให้ร่มเงาเล็บมือนางโตเร็ว ไม่กลายพันธุ์ เล็บมือนางเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้หลายอย่างตามตำราแพทย์แผนโบราณของไทย เช่น ใบและ ลำต้นขับพยาธิและตานซาง ใบใช้ตำพอกแผลสดฆ่าเชื้อหรือพอกฝี ผลกินแก้สะอึกและขับพยาธิไส้เดือน รากเป็นยาขับพยาธิไส้เดือนและแก้อุจจาระเป็นฟองอุจจาระขาวเหม็นคาวในเด็ก หัวแก้รสเอียน ขับพยาธิและตานซางตานขโมยและพุงโร การศึกษาทางเภสัชศาสตร์ พบว่า เมล็ด(ผล) ของเล็บมือนางมีสารสำคัญคือ Quisqualic acid มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการขับพยาธิ และเป็นยาระบาย(มาโนช และเพ็ญนภา, 2540) เมล็ดนำมาใช้ถ่ายพยาธิได้ ทั้งพยาธิไส้เดือน และพยาธิเส้นด้าย ใบอ่อนของเล็บมือนางใช้กินเป็นผักได้ นิยมบริโภคในอินโดนีเซีย ใช้ได้ทั้งดิบหรือนึ่งให้สุก(เดชา, 2543) มีรายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ได้จากน้ำต้มของเมล็ดเล็บมือนางมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าไส้เดือนและปลิงด้วย(วิทยา : หนังสือสารานุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้บ่อยในประเทศไทย) มีรายงานพบว่าสารสกัดเอทานอลจากต้นเล็บมือนางมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* และพบรายงานการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยสารสกัดเอทานอลจากต้นเล็บมือนาง(ธีรวุฒิและรัชนี, 2550)

ปัจจุบันมีรายงานการนำเล็บมือนางมาใช้ประโยชน์มากมาย ส่วนรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง ยังไม่มากนัก

โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางด้วยวิธี ABTS assay
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางด้วยวิธี ABTS assay
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

1.4 สมมุติฐานของโครงการวิจัย

เล็บมือนาง *Quisqualis indica* Linn. เป็นพืชไม้เลื้อย จัดอยู่ในวงศ์ Combretaceae ดอกมีลักษณะเป็นช่อมีสีแดงอมขาว หรือสีชมพู มีกลิ่นหอม ผลสีน้ำตาลแดงเป็นมัน มี 5 พู ถิ่นกำเนิดของเล็บมือนางอยู่บริเวณเอเชียใต้จนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้(เต็ม, 2549) ประโยชน์ของเล็บมือนางคือเป็นไม้ดอกที่งดงามและมีกลิ่นหอม ปลูกง่าย ทนทานอยู่ได้นาน ไม่ต้องการสารเคมีในการดูแลรักษา นิยมนำมาปลูกให้เลื้อยเป็นซุ้มอยู่ตามประตู ตามรั้ว หรือขึ้นร้านเป็นหลังคาที่นั่งพักผ่อน ให้ร่มเงา เล็บมือนาง เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้หลายอย่างตามตำราแพทย์แผนโบราณของไทย เช่น ใบและลำต้นขับพยาธิและตานซาง ใบใช้ตำพอกแผลสดฆ่าเชื้อหรือพอกฝี ผลกินแก้สะอึกและขับพยาธิไส้เดือน รากเป็นยาขับพยาธิไส้เดือนและแก้อุจจาระเป็นฟองอุจจาระขาวเหม็นคาวในเด็ก หัวแก้รสเอียน ขับพยาธิและตานซางตานขโมยและพุงโร เมล็ด(ผล) ของเล็บมือนางมีสารสำคัญคือ Quisqualic acid มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการขับพยาธิ และเป็นยาระบาย(มาโนช และเพ็ญนภา, 2540) เมล็ดเล็บมือนางนำมาใช้ถ่ายพยาธิได้ ทั้งพยาธิไส้เดือน และพยาธิเส้นด้าย ใบอ่อนของเล็บมือนางใช้กินเป็นผักได้ นิยมบริโภคในอินโดนีเซีย ใช้ได้ทั้งดิบหรือนึ่งให้สุกก่อน(เดชา, 2543) มีรายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ได้จากน้ำต้มของเมล็ดเล็บมือนางมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนัง และยังมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าไส้เดือนและปลิงด้วย(วิทยา : หนังสือสารานุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้บ่อยในประเทศไทย) มีรายงานพบว่า สารสกัดเอทานอลจากต้นเล็บมือนางมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* และพบรายงานการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยสารสกัดเอทานอล จากต้นเล็บมือนาง มีผลเป็นบวกคือ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น(ธีรวุฒิ และรัชนี, 2550)

โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมในเชิงพาณิชย์ และเป็นแนวทางในการวิจัยระดับต่อไป

1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

1.5.1 พืชที่ทำการศึกษา

เล็บมือนาง(*Quisqualis indica* Linn.)

1.5.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างส่วนลำต้นกับใบ และส่วนดอกของต้นเล็บมือนาง ในเขตอำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ

1.5.3 การสกัดสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

นำพืช(ลำต้นกับใบ และดอก)ที่ทำความสะอาดแล้วมาทำให้แห้ง โดยการอบที่ตู้อบลมร้อน 60˚c และบดให้ละเอียด นำไปสกัดด้วยตัวทำละลายคือ เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ และเฮกเซน ตามลำดับ เป็นเวลานาน 3 วัน กรองสารที่สกัดได้ แล้วนำสารที่สกัดได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสูญญากาศ(Rotary evaporator)

1.5.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity)

การทดสอบด้วยวิธี ABTS assay โดยการวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของRoberta และคณะ(1999) ทำได้โดยเตรียมสารละลาย ABTS (2,2’-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) โดยผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM $K_2S_2O_8$(Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากันแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน ABTS : น้ำเท่ากับ 1:4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 nm และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 5.0 mg/mL ด้วยสารละลาย absolute ethanol ผสมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว 2.0 mL กับสารละลายตัวอย่าง 20 μL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm หลังทิ้งไว้ 5 นาทีทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ คำนวณหา % inhibition จากสมการ

% inhibition = (Abs control – Abs sample X100)/Abs control

1.5.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* โดยการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง(% Inhibition) จากค่าความขุ่นของสารทดสอบเปรียบเทียบกับค่าความขุ่นของสารควบคุมและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % ขึ้นไป

1.6 นิยามศัพท์

เล็บมือนาง หมายถึง ชื่อไม้เถาชนิด *Quisqualis indica* L. ในวงศ์ Combretaceae ดอกออกเป็นช่อตามซอกใบ และปลายกิ่ง เมื่อเริ่มบาน กลีบดอกมีสีขาว หรือสีชมพูอ่อน แล้วค่อยๆ เข้มขึ้นเป็นสีชมพูและแดง มีกลิ่นหอมแรง เมล็ดใช้ทำยาได้

อนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (Outer orbital) เนื่องจากมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว(Unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุล ทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอนุมูลสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับ หรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสีย หรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่

สารต้านออกซิเดชัน(Antioxidant) คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชันแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ สารต้านออกซิเดชัน

การสกัดด้วยตัวทำละลาย หมายถึง วิธีการในการแยกสารและทำให้บริสุทธิ์ เช่น การสกัดแยกสารประกอบบางชนิดออกจากแหล่งที่เกิดในธรรมชาติเช่นใบไม้ ดอกไม้ การสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมหลังทำปฏิกิริยาหลักการของการสกัดคือการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษา

1.7.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง เป็นข้อมูลเพื่อใช้ประโยชน์ในการวิจัยทางคลินิก

1.7.2 นำผลงานวิจัยไปเผยแพร่ในรูปแบบการประชุมวิชาการ และเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ

1.7.3 บูรณาการผลการวิจัยสู่การเรียนการสอนรายวิชาปฏิบัติการวิเคราะห์ทางเคมี และด้านชีววิทยา

บทที่ 2

ทฤษฎี แนวคิด และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าจากเอกสาร ตำรา และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง ซึ่งผู้ศึกษาได้เรียงลำดับหัวข้อที่ศึกษา ดังต่อไปนี้

2.1 เล็บมือนาง

2.2 อนุมูลอิสระ

2.3 สารต้านออกซิเดชัน

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ

2.5 สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์

2.6 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

2.7 ตัวทำละลาย

2.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical

2.9 ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์(UV-VIS Spectrophotometer)

2.10 Bacillus cereus

2.11 Escherichia coli

2.12 Pseudomonas aeruginosa

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เล็บมือนาง(*Quisqualis indica* Linn.)

ชื่อสมุนไพร : อ้อยช้าง(อุตรดิตถ์), แสมแดง(ชุมพร), เล็บนาว(สตูล), มะจีมั่ง จ๊ามัง จะมั่ง(ภาคเหนือ), นิ้วมือพระนารายณ์(ใต้), ไท้หม่อง(กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), วะดอนิ่ง อะดอนิ่ง(มะลายู-ยะลา)(สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด, ออนไลน์, 2559)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Quisqualis indica* Linn.

ชื่อสามัญ : Rangoon Creeper, Chinese honey Suckle, Drunen sailor

ชื่อวงศ์ : Combretaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : โดยจัดเป็นไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็งขนาดกลาง เลื้อยพาดพันไปกับต้นไม้ต้นอื่น ยาวได้ประมาณ 5-7 เมตร และอาจเลื้อยไปได้ไกลมากกว่า 10 เมตร แตกกิ่งก้านสาขา

เป็นพุ่มหนาทึบ เถาอ่อนเป็นสีเขียว ตามลำต้นและเถาอ่อนมีขนสีเหลืองหรือสีน้ำตาลอมเทาปกคลุมอยู่ แต่ต้นแก่ผิวจะเกลี้ยง โดยเถาแก่เปลือกลำต้นเป็นสีน้ำตาลปนแดง เปลือกค่อนข้างเรียบ หรือมีหนามเล็กน้อย ต้องหาหลักยึดหรือร้านให้ลำเถามีที่เกาะยึด ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด การตอนกิ่ง หรือเอาเง้าไปปลูกก็ได้ แต่ต้องฝักให้ลึกประมาณ 4 นิ้ว เป็นพรรณไม้กลางแจ้ง ชอบแสงแดดแบบเต็มวัน ต้องการน้ำและความชื้นปานกลาง เจริญเติบโตได้ดีในดินปนทรายหรือดินร่วนปนทรายที่ระบายน้ำดี เติบโตได้เร็วและจะเลื้อยขึ้นเป็นพุ่มตามร้านที่เตรียมไว้ให้(เต็ม สมิตินันทน์, ออนไลน์, 2549)

ภาที่ 2.1 เล็บมือนาง

ใบอ่อนสามารถนำมารับประทานได้ นิยมรับประทานในอินโดนีเซีย ใช้ได้ทั้งดิบและสุกด้วยการต้ม นึ่ง ลวก ใช้รับประทานร่วมกับน้ำพริก โดยคุณค่าทางโภชนาการของใบเล็บมือนางต่อ 100 กรัม ประกอบไปด้วย พลังงาน 76 กิโลแคลอรี่ความชื้น 76.4 เปอร์เซ็นต์โปรตีน 4.8 กรัมไขมัน 0 กรัมคาร์โบไฮเดรต 18.1 กรัมใยอาหาร 2 กรัมวิตามินเอ 11,180 หน่วยสากลวิตามินบี 1 0.04 มิลลิกรัมวิตามินซี 70 มิลลิกรัมแคลเซียม 104 มิลลิกรัมและฟอสฟอรัส 97 มิลลิกรัม

ข้อควรระวังในเมล็ดเล็บมือนางมีพิษ ห้ามรับประทานมากเกินกว่าปริมาณที่กำหนดหากรับพิษจะทำให้มีอาการสะอึก อาเจียน วิงเวียนศีรษะ มึนงง อ่อนเพลีย และมีอาการถ่ายห้ามรับประทานยานี้ควบคู่กับน้ำชาหรือชาร้อน เนื่องจากจะลบฤทธิ์กัน(เดชา ศิริภัทร,2543, หน้า 252)

ประโยชน์ของเล็บมือนางเล็บมือนางเป็นพืชที่นำมาใช้ปลูกเป็นไม้ประดับซุ้ม หรือขึ้นร้านเป็นหลังคาที่นั่งผักผ่อน หรือปลูกตามริมถนน ริมทางเดิน จัดเป็นไม้โตเร็ว ปลูกง่าย มีดอกสวยงาม ให้กลิ่นหอมเย็น หรือจะนำมาปลูกริมทะเลก็ได้ เพราะทนน้ำท่วมขังทนสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี(เดชา ศิริภัทร,2543, หน้า 252)

2.2 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว(unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอนุมูลสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับ หรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสีย หรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูล-อิสระที่เกิดขึ้นมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่(chain reaction) ต่อไปเรื่อย ๆ โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่ว ๆ ไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง(pH) และความชื้น เป็นต้น(บุหรัน พันธุ์สวรรค์,2556, หน้า 275-286)

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุทางไฟฟ้า โดยมีประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระคือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล R แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก(R^+) เช่น อนุมูล pyridinyl(NAD^+) และประจุลบ(R^-) เช่น อนุมูล superoxide(O_2^-) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxyl(ROO) หรืออนุมูล thiyl(RS) เป็นต้น ซึ่งจากคำจำกัดความนี้ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม(Cl) และซิลเวอร์อะตอม(Ag) เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ เช่น Hydroxyl radical($HO^{\bullet}$), Superoxide anion radical(O_2^-) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอนุมูลสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกแตกต่างกัน ดังนี้

2.2.1 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ

2.2.1.1 การแตกของพันธะโควาเลนต์แบบโฮโมไลติก

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

2.2.1.2 การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^- \longrightarrow A^-$$

2.2.1.3 การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^+ + e^-$$

อนุมูลอิสระ และสารที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ(reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ(reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์(Peroxynitrite) ตัวอย่างอนุมูล-อิสระ และสารที่เกี่ยวข้องแสดงในตารางที่ 2.1 อนุมูลอิสระ และสารที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 2.1 อนุมูลอิสระ และสารที่เกี่ยวข้อง (โอภา วัชระคุปต์, ออนไลน์, 2550)

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species(ROS)	H_2O_2,Ozone(O_3)
Superoxide, Superoxide anion	Hypobromous acid(HOBr)
($O_2^{+\cdot}$)	Hypochlorous acid(HOCl)
Hydroxyl($HO^{\cdot}$)	Singlet oxygen($O_2^{1}\Delta g$)
Hydroperoxyl($HO_2^{\cdot}$)	Organic peroxides(ROOH)
Peroxyl($RO_2^{\cdot}$)	Peroxylnitrite(ONOO-)
Alkroxyl($RO^{\cdot}$)	Peroxylnitrous acid(ONOOH)

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน(Oxidation) หมายถึง ปฏิกิริยาที่โมเลกุลหรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากวงโคจรให้กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เรียกสารที่ทำหน้าเป็นตัวให้อิเล็กตรอนว่า ตัวรีดิวซ์(Reducing agent) และเรียกสารที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรองนี้ว่าตัวออกซิไดซ์(Oxidizing agent) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันมักจะเกี่ยวข้องกับออกซิเจน นอกจากนี้ออกซิเดชันยังหมายถึงการเสียไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลอีกด้วย ปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระนั้นมีความเกี่ยวข้อง เนื่องจากปฏิกิริยานี้ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของสารต่าง ๆ ได้มากมายหลายชนิดและอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่น ๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร้างหรือผลิตขึ้น เรียกขั้นตอนนี้ว่าขั้นตอนเริ่มต้น (initiation step) ขั้นที่สองเป็นขั้นที่อนุมูลถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ กันไป เรียกว่าขั้นก้าวหน้า(propagation step) และขั้นสุดท้ายเรียกว่า ขั้นสิ้นสุด(termination step) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความ

เสถียร โดยทั่วไปการที่โมเลกุลหรืออะตอมของสารที่มีอิเล็กตรอนเข้าคู่กันครบเสียอิเล็กตรอนไปกลายเป็นอนุมูลอิสระได้นั้นต้องอยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง แต่ก็มีโมเลกุลอีกหลายชนิดที่กลายเป็นอนุมูลอิสระได้เมื่ออยู่ในสภาวะปกติ ซึ่งรวมถึงสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่พบในสิ่งมีชีวิตด้วยซึ่งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระที่มักพบในสภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตดังนี้

ขั้นสายโซ่เริ่มต้น(chain initiation) อนุมูลอิสระเกิดมาจากกลไกต่าง ๆ กันได้หลายวิธี คือ การแตกพันธะของโมเลกุลที่เรียกว่า โฮโมไลซิส(Homolysis) หรือการแตกพันธะเนื่องจากแสง (photolysis) หรือผลของรังสี(radiolysis) หรือมาจากปฏิกิริยารีดอกซ์(redox) ซึ่งปฏิกิริยาทั้งสี่จัดเป็นกลไกพื้นฐานในการสร้างอนุมูลอิสระจากสารอินทรีย์

ก. บอนด์ฮีโมไลซิส(Bond hemolysis)

โมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีอิเล็กตรอนวงนอกสุด(valence electron) เป็นจำนวนคู่แล้วในทางทฤษฎีสามารถแยกออกจากกันให้ผลลัพธ์เป็นอนุมูลอิสระได้โดยในสภาวะที่อุณหภูมิปกติการที่อิเล็กตรอนคู่ในพันธะโควาเลนท์สามารถแยกจากกันไปให้อะตอมแต่ละตัวได้นั้นต้องเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานระหว่างพันธะที่อ่อนมากเช่น disulfide และการเกิดปฏิกิริยาจะมีอัตราที่ช้ามากจึงคาดว่าไม่น่าจะเกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่าง Bond homolysis แสดงได้ดังสมการต่อไปนี้

$$ROOR \longrightarrow 2RO^{\bullet}$$

ข. โฟโตไลซิส(Photolysis)

เป็นการแตกพันธะของโมเลกุลจากการดูดพลังงานแสง เช่น แสงอุลตร้าไวโอเลตทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ที่พบมากคือการแตกพันธะของ hydrogen peroxide(H_2O_2) กลายเป็นอนุมูล hydroxyl($HO^{\bullet}$) โดยในสิ่งมีชีวิตพลังงานแสงจะถูกดูดโดยโมเลกุลที่มีความไวต่อแสง เช่น รงควัตถุและสารอะโรมาติกคาร์บอนบางชนิด หลังดูดพลังงานแสงแล้วจะทำให้โมเลกุลอยู่ในสถานะที่ตื่นตัว(excited state) จึงต้องมีการปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อให้โมเลกุลกลับเข้าสู่สถานะพื้น (ground state) ดังเดิมและวิธีหนึ่งของการคายพลังงานคือ การแตกพันธะของโมเลกุลเกิดเป็นอนุมูลอิสระ 2 ตัว ดังนี้

$$ROCl \longrightarrow RO + Cl^{\bullet}$$

$$RCOO_2 \longrightarrow 2RCOO^{\bullet}$$

ค. เรดิโอไลซิส(Radiolysis)

พลังงานจากรังสีชนิดต่าง ๆ เช่น รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ และอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงสามารถทำให้เกิดการแตกพันธะโควาเลนท์ของโมเลกุลสารได้โดยเฉพาะโมเลกุลน้ำจะให้อนุมูลประจุบวก(H_2O^{+}) และอนุมูล hydroxyl($HO^{\bullet}$) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นตัวที่มีความไวในการ

เข้าทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์สูง ทำให้เกิดอนุมูลอิสระออกมามากมาย นอกจากนี้รังสียังทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยตรงจากสารองค์ประกอบเคมีของเซลล์อีกด้วย โดยเฉพาะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวในร่างกายสิ่งมีชีวิต ซึ่งปฏิกิริยานี้นับเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

ง. ปฏิกิริยารีดอกซ์(Redox reaction)

ปฏิกิริยารีดอกซ์ หรือเรียกอีกอย่างว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบทางชีววิทยา ปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชันบางชนิดมีประโยชน์ แต่มีปฏิกิริยาออกซิเดชันบางชนิดก่อให้เกิดความเสียหาย โดยสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ ที่สำคัญคือโมเลกุลของอนุมูลsuperoxide(O_2^-) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง(intermediate) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย และเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้ปฏิกิริยารีดอกซ์ของไอออนโลหะในร่างกายก็จัดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยเฉพาะเหล็ก(Fe^{2+}) และทองแดง(Cu^{2+}) โดยไอออนโลหะเปรียบเสมือนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดอกซ์

ขั้นลูกโซ่ก้าวหน้า(chain propagation) เป็นขั้นที่อนุมูลอิสระมีการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของสารอื่น ซึ่งปฏิกิริยาจะดำเนินต่อ ๆ กันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้อนุมูลอิสระชนิดใหม่ออกมาตลอดเวลา จัดเป็นการเปลี่ยนตำแหน่งของอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่(unpaired electron)ซึ่งสามารถแบ่งกลไกของปฏิกิริยาในขั้นก้าวหน้าได้ 3 ชนิด ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบทางชีววิทยาที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต คือ

ก. การถ่ายทอดอะตอม หรือกลุ่มของอะตอม(atom or group transfer)

จัดเป็นกลไกที่เกิดมากที่สุดในลำดับของพรอพาเกชัน โดยปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับการดึงไฮโดรเจนดังสมการ

$$Cl + RH \longrightarrow HCl + R^{\bullet}$$

$$R_1 + R_2Cl \longrightarrow R_1Cl + R_2$$

ข. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน(electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระที่เป็นกลางหรือมีประจุลบไปให้โมเลกุลที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ(non - radical molecule) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชันในไขมัน

ค. การเติมอนุมูลอิสระ(addition of radicals)

เป็นการเติมกลุ่มอนุมูลอิสระเข้าไปในโมเลกุลต่าง ๆ ดังสมการ

$$R + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

ตัวอย่างของปฏิกิริยานี้ได้แก่ การเติมอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของไขมัน(Lipid peroxidation) แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแสดงได้ดังสมการ

Chain initiation:

$$L - H \longrightarrow L + \text{radical } H$$

Chain propagation:

$$L^{\bullet} \longrightarrow L - O - O^{\bullet}$$

$$L - O - O^{\bullet} \longrightarrow L - O - O - H + L^{\bullet}$$

Chain termination:

$$L + L^{\bullet} \longrightarrow L - L$$

ขั้นลูกโซ่สิ้นสุด(chain termination) เป็นขั้นหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระประกอบด้วยกลไกหลัก 3 ชนิด คือ

ก. การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ(Homo - linking and cross - linking of radicals)

เป็นการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุล โดยการนำอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ของแต่ละโมเลกุลอนุมูลอิสระมาสร้างพันธะกัน ได้เป็นสารโมเลกุลใหม่ที่มีพันธะร่วมกันหากเป็นการรวมตัวกันระหว่างอนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลที่เป็นชนิดเดียวกัน เรียกโมเลกุลสารใหม่ที่ได้ว่า โฮโมไดเมอร์ (homodimer) แต่ถ้าเป็นการรวมตัวของอนุมูลอิสระต่างชนิดกันเรียกเฮทเทอโรไดเมอร์ (heterodimer) ซึ่งกลไกนี้เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการสร้างสารชีวโมเลกุลที่มีความเสถียรขึ้นมาใหม่ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตเช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิกและไขมัน เป็นต้น การรวมตัวกันของอนุมูลอิสระแสดงได้ดังนี้

$$ROO + R^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$2ROO^{\bullet} \longrightarrow ROO^{-}OOR$$

$$2R^{\bullet} \longrightarrow R^{-}$$

ข. การกำจัดอนุมูลอิสระ(Radical scavenging)

คำว่า Scavenge หมายถึง การกำจัดเอาขยะและสิ่งที่ไม่ต้องการออกไป ซึ่งในกรณีนี้เปรียบอนุมูลอิสระได้กับสิ่งที่ไม่ต้องการ ซึ่งการกำจัดออกจะกระทำโดยสารกลุ่มหนึ่งเรียกว่า

สแคเวนเจอร์(scavenger) หรือสารต้านออกซิเดชัน(antioxidant) เช่น สารประกอบฟีนอลิกซึ่งจัดเป็นradical scavenger ที่มีประสิทธิภาพรวมทั้งวิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ เป็นต้น

ค. การถ่ายทอดอิเล็กตรอน(Electron transfer)

เป็นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ของอนุมูลอิสระออกจากโมเลกุล หรือเป็นการรับเอาอิเล็กตรอน 1 ตัวจากภายนอกมาเข้าคู่กับอิเล็กตรอนเดิมที่ยังมีที่ว่างอยู่ในโมเลกุล ทำให้สภาวะการเป็นอนุมูลอิสระหมดไป เช่น อนุมูล superoxide(O_2^-) เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนปกติ(O_2) เป็นต้น

2.3 สารต้านออกซิเดชัน(Antioxidant)

สารต้านออกซิเดชัน(antioxidant) คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชันแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม โปรตีนซึ่งมีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) ส่วนอีกประเภทหนึ่ง คือสารต้านออกซิเดชัน ในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ได้แก่ วิตามินอีเบต้า - แคโรทีน, วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์นอกจากวิธีนี้ยังมีสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจอีกด้วย(วัลยา เนาวรัตน์,2542, หน้า 196-198)

สารต้านออกซิเดชัน สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น3 ชนิดดังนี้

2.3.1 Preventive antioxidantป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ

2.3.2 Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

2.3.3 Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ(เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม,2554, หน้า 59-70)

2.4.1 วิตามินเอ ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้จัดเป็นPrecursor ของวิตามินเอ เรียกว่าโปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียวผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง

2.4.2 วิตามินซีมีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิค(Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxyl นอกจากวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสาร

ต้านออกซิเดชันของวิตามินอีกด้วย โดยทำให้อนุมูลα - tocopherol(TO) เปลี่ยนกลับไปเป็นα-tocopherol (TOH) ดังเดิม ดังสมการ

$$TO + AH^{\cdot} \longrightarrow TOH + A^{\cdot}$$

2.4.3 วิตามินอี เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญโดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันตัวอื่น ๆ เช่น วิตามินซีและซิลิเนียมเป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มีผลมาจากโลหะ เช่น ตะกั่วในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือโทโคฟีรอล และโทโคไท-อินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อย ๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา(α-), เบต้า(β-), แกมมา(γ-) และเดลต้า(δ-) วิตามินอี ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyl ดังสมการ

$$\alpha\text{- tocopherol} + LOO^{\cdot} \longrightarrow \alpha\text{- tocopherol}^{\cdot} + LOOH$$

อนุมูล α - tocopherol ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyl ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร(LOO -α - tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง

$$\alpha\text{- tocopherol} + LOO^{\cdot} \longrightarrow LOO - \alpha - \text{tocopherol}$$

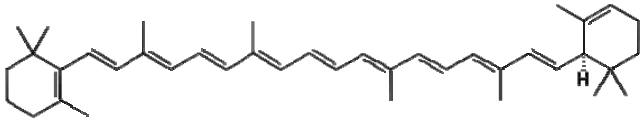
2.4.4 ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี เป็นสารต้านออกซิเดชันทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซิลิเนียม และวิตามินอี ร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีหน้าที่หลายอย่างเช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่แรงให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย

หน้าที่ต่างๆ เหล่านี้จึงทำให้มีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช้อนุมูลอิสระ(non - radical product)

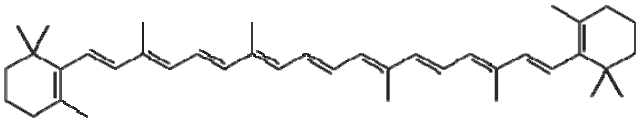
2.4.5 แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์ของพืช และพบมากในผักและผลไม้สุก โครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เรียกว่า tetraterpene skeleton ซึ่งอาจมีวงแหวนที่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสอง

ด้านของโมเลกุล วงแหวนนี้อาจเป็นวงแหวนห้า หรือหกเหลี่ยมก็ได้ แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามองค์ประกอบของโครงสร้างในโมเลกุล ดังนี้

2.4.5.1 แคโรทีน(Carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเช่น เบต้า - แคโรทีน(β- carotene) อัลฟา-แคโรทีน(α- carotene) แกมมา-แคโรทีน(γ- carotene) ไลโคปีน(lycopene) เป็นต้นซึ่งเบต้า- แคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามิเอ การเปลี่ยนรูปจากเบต้า - แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอโดยการแตกพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางของโมเลกุลโดยเอนไซม์ carotene deoxygenase เมื่อเบต้า - แคโรทีน สามารถดักจับอนุมูลอิสระเข้าไว้ในโมเลกุลแล้วโมเลกุลของเบต้า– แคโรทีนจะอยู่ในลักษณะที่มีความเสถียร



(ก.)



(ข.)

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมี (ก.) อัลฟ่า - แคโรทีน(α-carotene) และ (ข.) เบต้า – แคโรทีน (β-carotene)

ที่มา: www.en.wikipedia.org, ออนไลน์, 2560

2.4.5.2 ออกโซแคโรทีนอยด์(oxocarotenoid) หรือ แซนโทฟีล(xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โครงสร้างโมเลกุลบริเวณวงแหวนประกอบด้วยกลุ่มอื่นนอกเหนือจากคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น เบต้า - คริบโทแซนทิน(β-cryptoxanthin) และลูทีน(lutein)

2.4.5.3 สารประกอบฟีโนลิก(phenolic compounds)สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์(glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์(cell vacuole) สารประกอบฟีโนลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์(flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบเช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ

polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tannin เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์(alkaloid) และเทอร์พีนอยด์(terpenoid) เป็นต้น พบว่าสารประกอบฟีโนลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่นฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก และแทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกทำหน้าที่เป็นตัวขับไล่อนุมูลอิสระที่สำคัญคืออนุมูล peroxyl โดยมีกลไก 2 แบบคือเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบ ฟีโนลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นก้าวหน้าได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีโนลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน(quercetin)สารประกอบฟีลิกยังทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอนหรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่าง ๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป

2.4.5.4 ฟลาโวนอยด์(ไบโอฟลาโวนอยด์) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากชนิดหนึ่งจะพบมากในพืชผักและผลไม้มีหน้าที่สองอย่างคือเป็นรงควัตถุ ทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง และทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์พืชออกไป ความสามารถของการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ และคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ยังสามารถช่วยลดการอักเสบ ช่วยไม่ให้หลอดเลือดแข็งตัว ทำให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้น ต่อต้านแบคทีเรียและไวรัส ลดโคเลสเตอรอล และช่วยเสริมการทำงานของวิตามินซีพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ส้ม พริกไทย และพวกเบอร์รี่ต่าง ๆ เป็นต้น ฟลาโวนอยด์ แบ่งได้เป็น5 ประเภทใหญ่ คือ

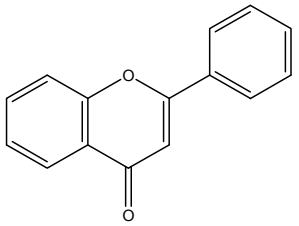
ก) แอนโธไซยานิดิน(anthocyanidin), แอนโธคลอร์ส(anthochlors) และออโรนัส(auronus) เป็นรงควัตถุในพืชให้สีน้ำเงินแดง(red - blue) คือให้สีช่วงสีแดงถึงสีน้ำเงินขึ้นกับชนิดของพืช พบในบลูเบอร์รี่ เชอรี่ องุ่นแดง หัวหอม กะหล่ำปลี เป็นต้น แอนโธคลอร์ส เป็นรงควัตถุ ที่ให้สีเหลือง พบมากในดอกไม้

ข) ฟลาโวนอยด์ที่พบน้อยในธรรมชาติ(minor flavonoid)ได้แก่ ฟลาโวโนน (flavonones) ฟลาวาน - 3 - ออล(flava - 3 - ols) ได้ไฮโดรฟลาโวน(dihydroflavone) และได้ไฮโดรชาล์โคน(dihydrochalcones) กลุ่มนี้พบในพืชตระกูลส้ม(citrus) ได้แก่ ส้ม องุ่น แต่จะพบในส่วนที่เป็นน้ำ

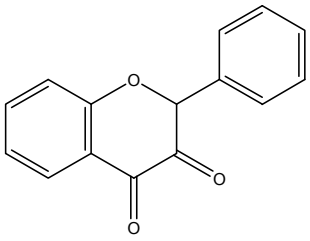
ค) ฟลาโวน(flavone) และฟลาโวนอล(flavonols) เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดของฟลาโวนอยด์พบในบลูเบอร์รี่ เชอรี่หวาน บล็อกโคลี หัวหอม ชาดำ ชาเขียว ไวน์แดง มันฝรั่ง มะเขือ-เทศ แครอท ผักขม ส้ม ลูกแพร แอปเปิ้ล องุ่น เป็นต้น

ง) ไอโซฟลาโวนอยด์(isoflavonoid) พบมากในพืชตระกูลถั่ว (*Leguminosae*; Legume) พวกนี้สามารถเปลี่ยนเป็นไอโซฟลาโวน(isoflavone) เทอโรคาร์แปนส์ (terocarpans) ไอโซฟลาวาน(isoflavans) และโรทีนอยด์(rotenoid) ได้โดยทั่วไปจะรวมถึงเจนีสทีน (genistein) ไบโอชานิน เอ(biochanin a) และไดด์ซีน(daidzein)

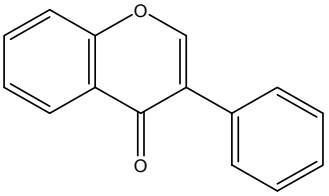
จ) แทนนิน(tannin) โปรแอนโธไซยานิดิน เป็นสารประเภทโพลิฟีนอล (polyphenols) แทนนินสามารถเพิ่มค่าการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากสามารถจับกับโปรตีนได้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม,2554, หน้า 59-70)



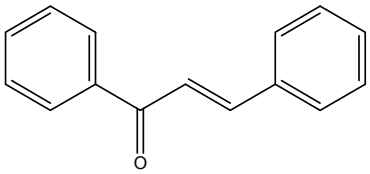
(ก.) Flavone



(ข.) Flavonone



(ค.) Iso-flavone



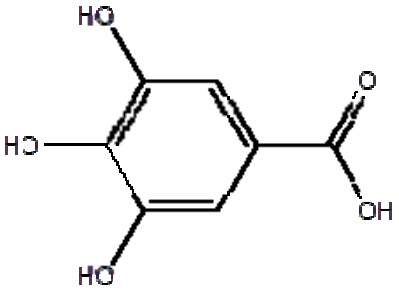
(ง.) Chalcone

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลลิกชนิดต่าง ๆ
ที่มา: www.foodnetworksolution.com, ออนไลน์, 2560

2.5 สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์

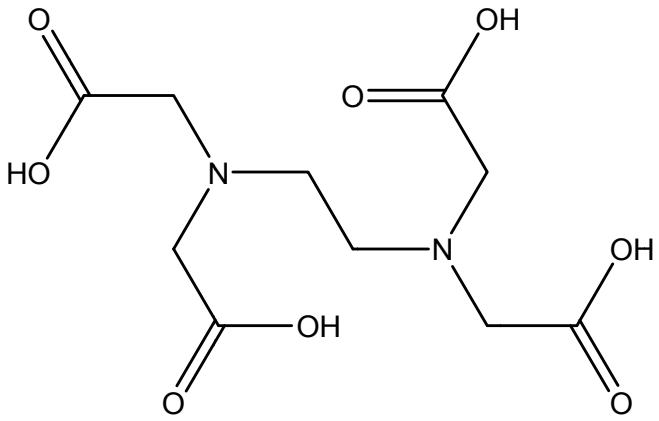
สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้น ส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้โครงสร้างของสารต้านออกซิเดชันที่มีในธรรมชาตินำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่ดีมากขึ้นเช่น สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาจากสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติโดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล

Gallic acid หรือ3, 4, 5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ โดย Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่น ๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี

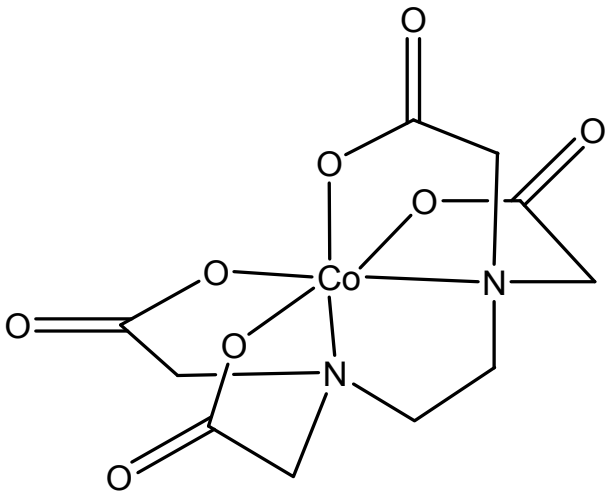


ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid
ที่มา: www.en.wikipedia.org, ออนไลน์, 2560

Anonymous, No date หรือ Ethylenediaminetetraacetic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$มีคุณสมบัติเป็นสารคีเลตโดยการจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคดเมียม แมงกานีส และทองแดง ซึ่งประโยชน์ทางการแพทย์สามารถนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่าง ๆ ได้(วิภาดา กันทยศ, ออนไลน์, 2554)

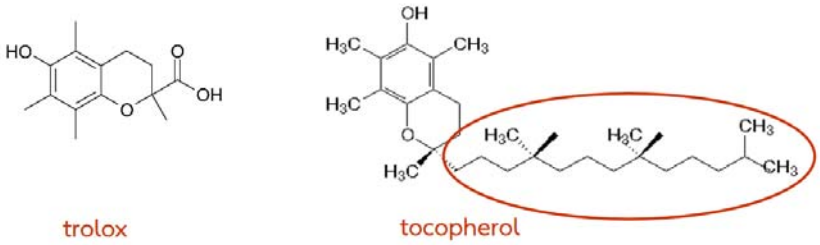


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA
ที่มา: www.en.wikipedia.org, ออนไลน์, 2560



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ EDTA จับกับไอออนของโลหะ
ที่มา: www.en.wikipedia.org, ออนไลน์, 2560

โทรลอกซ์(Trolox) เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนแปลงสายอัลเคนให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงทำให้ออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าวิตามินอี ซึ่งในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนิยมใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ (วิตามินอีและ Trolox, ออนไลน์, 2560)

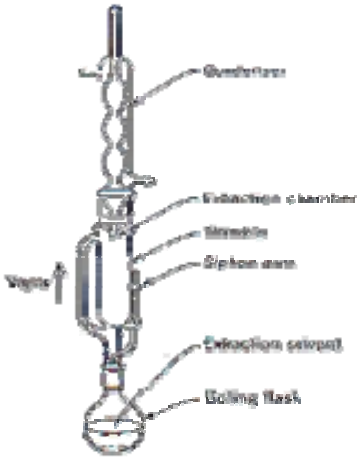


ภาพที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของโทรลอกซ์
ที่มา: www.kpi.msu.ac.th, ออนไลน์, 2561

2.6 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์มากในการแยกสาร และทำให้บริสุทธิ์ เช่น การสกัดแยกสารประกอบบางชนิดออกจากแหล่งที่เกิดในธรรมชาติเช่นใบไม้ ดอกไม้ การสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมหลังทำปฏิกิริยาหลักการของการสกัดคือการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม(Halliwell, B. ,1999, p.261)

2.6.1 การสกัดของแข็งด้วยของเหลว(Solid/Liquid Extraction) เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของแข็งการสกัดแบบนี้มีหลักการไม่แตกต่างจากการหาตัวทำละลายเพื่อตกผลึกสารโดยการนำของแข็งที่สามารถทำการละลายสกัดด้วยตัวทำละลายของเหลว ซึ่งการละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัดหรือตัวทำละลายของเหลวและเวลาที่ใช้ในการสกัดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างของแข็งถ้าตัวถูก-ละลายเพียงดูดซับที่ผิวของของแข็ง การสกัดจะใช้เวลาน้อยแต่ถ้าตัวถูกละลายอยู่ในภายในของแข็งจะต้องใช้เวลามากกว่าและถ้าปรากฏว่าการกระจายของตัวทำละลายสู่ภายในของแข็งเกิดได้ช้ามากจำเป็นต้องบดของแข็งให้ละเอียดก่อนทำการสกัด เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดเป็นแบบซ็อกเล็ต(Soxhlet extractor) เป็นอุปกรณ์ที่ออกแบบมาสำหรับสกัดสารให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งนิยมใช้ในกรณีที่สารที่จะสกัดละลายได้ดีนักในตัวทำละลายอินทรีย์ที่จะสกัด(การสกัดด้วยตัวทำละลาย, ออนไลน์, 2558)

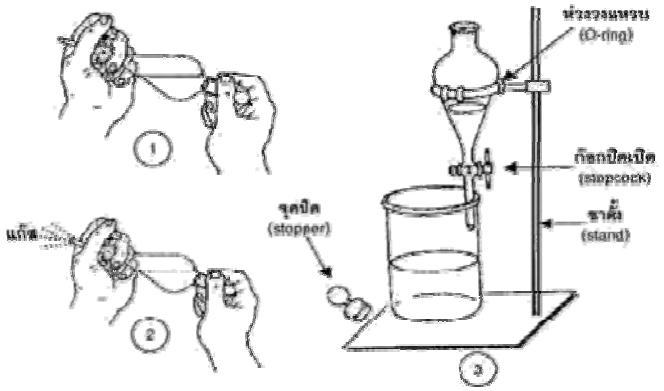


ภาพที่ 2.8 การจัดตั้งอุปกรณ์การสกัดของแข็งด้วยของเหลว
ที่มา: www.myfirstbrain.com, ออนไลน์, 2560

จากภาพที่ 2.8 การสกัดทำโดยอาศัยหลักการการให้ตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอจากนั้นจะกลั่นตัวเป็นของเหลวผ่านลงไปในสาร(ของแข็งหรือของเหลว) จากนั้นตัวทำละลายที่ได้สัมผัสกับสารจะไหลลงสู่ขวดรองรับ ตัวทำละลายที่พาสารลงมาในขวดนี้จะถูกระเหยกลับขึ้นไป(ทิ้ง

สารที่สกัดออกมาไว้ในขวดรองรับ) แล้วกลั่นตัวลงบนสารซ้ำแล้วซ้ำอีกดังนี้ไปเรื่อย ๆ การกระทำเช่นนี้จะทำให้ได้สารที่ต้องการสกัดในขวดรองรับในที่สุด

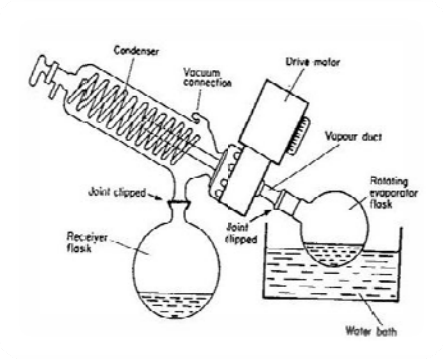
2.6.2 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว(Liquid/Liquid Extraction) ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดควรมีสมบัติเช่นเดียวกับตัวทำละลายที่เลือกสำหรับตกผลึกสารโดยสารสกัดผสมที่เป็นของเหลวหรือของผสมที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีกว่า และไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายเดิม ตัวทำละลายที่ใช้ต้องมีจุดเดือดไม่สูงนัก เพื่อที่จะกำจัดออกไปจากสารที่ต้องการได้ง่าย หลังการสกัดต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารหรือตัวทำละลายอื่นที่จะใช้ร่วมกันไม่ควรติดไฟง่ายไม่ควรมีพิษ และราคาไม่แพงตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate และ1-butanol ในทางปฏิบัติมักจะนิยมสกัดสารอินทรีย์ ซึ่งอาจละลายหรือแขวนลอยอยู่ในวัฏภาคน้ำด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำเมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกชั้นสารทั้งหลายที่มีอยู่ในของผสมจะละลายอยู่ทั้งในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ และชั้นน้ำมากน้อยตามความสามารถในการละลายของมันในตัวทำละลายแต่ละชนิด หลักเกณฑ์การละลายของสารโดยทั่วไปคือสารที่แตกตัวเป็นไอออนได้หรือสารที่มีพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้จะอยู่ในชั้นน้ำมากในขณะที่สารที่ไม่มีขั้วจะอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนใหญ่มีขั้วน้อย(การสกัดด้วยตัวทำละลาย, ออนไลน์, 2558)



ภาพที่ 2.9 การจัดตั้งอุปกรณ์การสกัดของเหลวด้วยของเหลว
ที่มา: www.hemsci.kku.ac.th, ออนไลน์, 2560

2.6.3 โรตารี อีวาโปเรเตอร์(Rotary Evaporator) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการระเหยสารตัวอย่างของเหลวโดยการกลั่นเพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ออกจากสารที่สนใจ ทำให้สารที่สนใจเข้มข้นขึ้นโดยตัวทำละลายที่ละลายสารที่สนใจจะถูกทำให้กลายเป็นไอด้วยระบบสุญญากาศจากปั๊ม

และให้ความร้อนแก่ตัวอย่าง เพื่อทำให้การกลายเป็นไอง่ายขึ้น จากนั้นได้สารละลายจะผ่าน condenser ที่มีระบบหล่อเย็น ทำให้ไอสารควบแน่นกลายเป็นของเหลวไหลลงสู่ Receiving Flask



ภาพที่ 2.10 เครื่องการกลั่นแบบระเหยสารแบบหมุนโรตารี อีวาโปเรเตอร์
ที่มา: www.images.slideplayer.in.th,ออนไลน์, 2560

2.7 ตัวทำละลาย (Solvent)

เมทานอล(Methanol) หรือ เมทิลแอลกอฮอล์(Methyl alcohol) มีสูตรโครงสร้างแบบย่อ CH_3OH เป็นของเหลวใส ระเหยง่าย เป็นพิษ นิยมใช้เป็นตัวทำละลาย และใช้เป็นเชื้อเพลิงในธรรมชาติ เมทานอลเป็นผลิตภัณฑ์จากการสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียหลายชนิด(ดูการผลิตเมทานอลจากของเสียเพื่อทำเป็นก๊าซชีวภาพ) ซึ่งเมทานอลจะระเหยออกสู่อากาศภายนอก แล้วสลายตัวได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำหากเราเผาเมทานอลกับอากาศจะได้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ดังสมการ $2CH_3OH + 3O_2 \longrightarrow 2CO_2 + 4H_2O$ ซึ่งเปลวไฟที่ได้จากการเผาเกือบจะมองไม่เห็น ดังนั้นจึงควรระมัดระวังหากมีการใช้เมทานอลเป็นเชื้อเพลิง

เอทานอล(Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์(Ethyl alcohol) มีสูตรเคมี C_2H_5OH เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการนำเอาพืชมาหมักเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์หรือกรดบางชนิดช่วยย่อย เมื่อทำให้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95 เปอร์เซ็นต์โดยการกลั่น ส่วนใหญ่ผลิตจากพืช สองประเภทคือ พืชประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย บีทรูท และพืชจำพวกแป้งเช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น

ไดเอททิล อีเทอร์ ชื่อภาษาอังกฤษ Diethyl Ether มีสูตรเคมี $C_2H_5OC_2H_5$ ประโยชน์ ใช้เป็นยาสลบในทางการแพทย์และใช้ เป็นยาเบื่อสัตว์ ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ คุณสมบัติทางเคมี เป็นของเหลวไม่มีสีกลิ่นฉุน จุดเดือดอยู่ที่34.6 °C จุดหลอมเหลวอยู่ที่ -116.3 °C ความคงตัวและการเกิดปฏิกิริยาเคมี ความคงตัวทางเคมี เป็นสารนี้มีความเสถียร สารที่เข้ากันไม่ได้

สารออกซิไดส์ ความร้อน สารเคมีอันตรายที่เกิดจากการสลายตัว คาร์บอนไดออกไซด์, คาร์บอนมอนนอกไซด์ การเกิดอัคคีภัยและการระเบิด สารนี้เป็นสารไวไฟมาก ไอระเหยของสารสามารถแพร่กระจายออกไปถึงแหล่งจุดติดไฟและอาจเกิดการติดไฟและอาจเกิดการติดไฟย้อนกลับมา ภาชนะบรรจุของสารอาจเกิดการระเบิดได้เมื่อสัมผัสกับความร้อนหรือไฟ การจัดเก็บ เก็บในภาชนะบรรจุที่ปิดมิดชิด เก็บในบริเวณที่เย็นและแห้ง เก็บในบริเวณที่มีการระบายอากาศเพียงพอ เก็บห่างจากแหล่งจุดติดไฟ ห้ามสูบบุหรี่ มีวิธีการระมัดระวัง การเกิดประจุไฟฟ้าสถิต

คลอโรฟอร์ม หรือที่รู้จักกันในชื่อ ไตรคลอโรมีเทน(Trichloromethane: TCM) เป็นสารประกอบที่มีสูตรเคมี $CHCl_3$ ไม่เกิดการเผาไหม้ในบรรยากาศปกติ ยกเว้นเมื่อผสมกับสารไวไฟกว่าอื่นๆ เป็นสารประกอบในกลุ่มไตรฮาโลมีเทน คลอโรฟอร์มมีประโยชน์ใช้งานหลายอย่าง เป็นสารตั้งต้น ตัวทำปฏิกิริยา และเป็นตัวทำละลาย ไตรคลอโรมีเทนเป็นสารควบคุมเพราะเป็นอันตรายต่อสิ่งพิมพ์แล้ว

เฮกเซน(Hexane) เป็นสารที่ผลิตได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบหรือการแยกก๊าซปิโตรเลียมเหลว ที่ถูกนำมาใช้งานสำหรับเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ การสกัดสารอินทรีย์จากสมุนไพร หรือใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเป็นตัวทำละลายสี เป็นต้น ลักษณเฉพาะคือ ชื่ออื่นที่เรียก Naphtha(petroleum), hydrotreated light, diproply และ gettysolv-b สถานะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นฉุน สูตรโมเลกุล C_4H_{14}(เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน, ออนไลน์, 2560)

2.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical

วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2, 2'-azino-bis(3–ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^+$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้าเขียว มีค่าความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ 660, 734 และ 820 นาโนเมตร แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^+$ ให้เป็น 0.7 - 0.9 เมื่อทำการเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันจะทำให้ $ABTS^{+\bullet}$ ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลงและสามารถนำไปคำนวณเป็นร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(% inhibition) ได้ตามสมการ

$$\%\ \text{inhibition} = \frac{|A_{734\ \text{control}} - A_{734\ \text{testsample}}|}{A_{734\ \text{control}}} \times 100$$

ในทางชีวเคมี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS เป็นสารประกอบเคมี ใช้ในการสังเกตปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจง การใช้โดยทั่วไปคือ

enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) เพื่อตรวจสอบสำหรับการจับของโมเลกุลซึ่งกันและกัน

นิยมใช้เป็นสารตั้งต้นกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ สำหรับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหรือเอนไซม์ออกซิเดสที่มีทองแดงหลายโมเลกุล เช่น แลกเคส หรือ บิลิรูบินออกซิเดส ช่วยให้ติดตามจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดสได้ สามารถใช้ติดตามจลนพลศาสตร์ปฏิกิริยาของเอนไซม์ใด ๆ ที่ผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์โดยอ้อม หรือตรวจสอบปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในตัวอย่าง

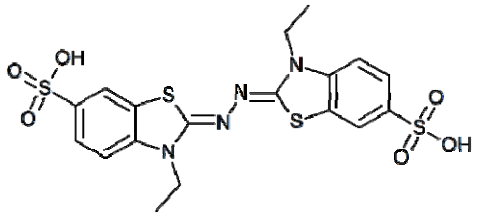
ศักยภาพรีดักชันของ ABTS จะสูงพอที่จะทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอนสำหรับโมเลกุลของ oxo เช่น โมเลกุลออกซิเจนและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ค่าพีเอชที่น้อยมากในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ภายใต้สภาวะนี้ หมู่ซัลโฟเนตเป็นตัวให้โปรตรอนที่เต็มที่ในสภาวะ dianion

$$ABTS^{-} + e^{-} \longrightarrow ABTS^{2-} \quad E^{\circ\prime} = 0.67 \text{ V vs SHE}$$

$$ABTS + e^{-} \longrightarrow ABTS^{-} \quad E^{\circ\prime} = 1.08 \text{ V vs SHE}$$

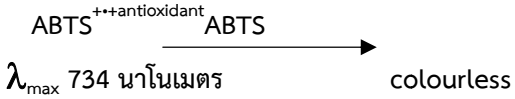
สารนี้ถูกเลือกเพราะเอนไซม์กลุ่มนี้ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เปลี่ยนให้เป็นผลิตภัณฑ์สีเขียวและละลายน้ำได้ การดูดกลืนแสงสูงสุดของผลิตภัณฑ์อยู่ที่ 420 นาโนเมตร ($\varepsilon = 3.6 \times 104\ M^{-1}\ cm^{-1}$) ซึ่งตรวจได้ด้วย Absorptionspectrophotometer และใช้ในการตรวจปริมาณกลูโคส เช่น ในเลือด

ABTS ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและงานวิจัยทางการเกษตรเพื่อวัดความสามารถของสารต้าน-อนุมูลอิสระในอาหาร โดย ABTS ถูกเปลี่ยนเป็นไอออนบวกเรดิคัล ด้วยการเติมโซเดียมเพอร์ซัลเฟต ไอออนบวกเรดิคัลนี้เป็นสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ไอออนบวกเรดิคัลของ ABTS ทำปฏิกิริยาต่อสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่รวมทั้งโพลิฟีนอล ไทออล และวิตามินซี ไอออนบวกเรดิคอลสีน้ำเงินของ ABTS ถูกแปลงกลับไปเป็นรูปไม่มีสีที่เป็นกลาง และตรวจวัดได้ การตรวจวัดนี้เรียกว่าวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) ซึ่งปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดจะเทียบกับค่าของ Trolox ซึ่งเป็นแอนาลอกของวิตามินอี



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS
ที่มา: www.th.wikipedia.org, ออนไลน์, 2560

ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity(TEAC) ข้อดีของวิธีนี้คือทำได้ง่ายอนุมูล $ABTS^{+}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชันอนุมูล $ABTS^{+}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำหรือละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้ คือ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย(กฤตติญารัตน์ สมวงศ์ และชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา,2555, หน้า 125- 134)



ภาพที่ 2.12 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ ABTS [2, 2 - azino - bis(3 - ethylbenzthiazoline - 6 - sulphonic acid)]
ที่มา: *www.*science.buu.ac.th, ออนไลน์, 2560

2.9 ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์(UV-VIS Spectrophotometer)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของการที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มี

ระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง(absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้(หลักการ uv-vis spectrophotometer, ออนไลน์, 2561)

ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลารวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วยหลอดกำเนิดแสงมีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ตัวอย่างแหล่งกำเนิดแสง ช่วง UV ใช้หลอด H_2 and D_2 lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทรสโกปี UV molecular absorption และช่วง visible ใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทร-สโกปีเป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

Monochromatorส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์(กระจกสี) ปริซึม(prism) หรือ เกรตติ้ง(grating)

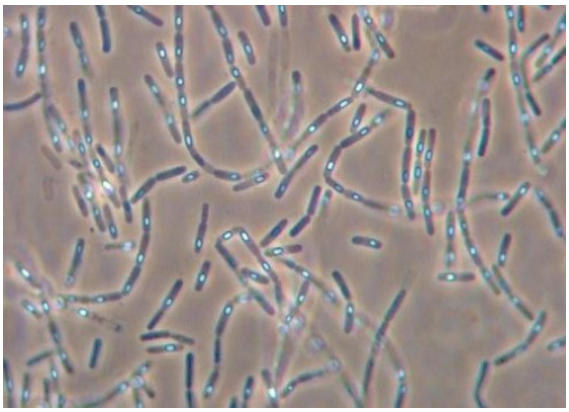
เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่างเซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (cell sample) บางครั้งอาจเรียกว่าคิวเวทท์(cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์(quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

Detectorทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือหลอดโฟโต-มัลติพลายเออร์(photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector)

2.10 Bacillus cereus

Bacillus cereus คือ แบคทีเรีย(Bacteria) ในกลุ่ม Bacillus ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรค (Pathogen) ย้อมติดสีแกรมบวก(Gram Positive Bacteria) รูปร่างเป็นท่อน(Rod Shape) สร้างสปอร์(Spore Forming Bacteria) เจริญได้ในที่มีอากาศ(Aerobic Bacteria) สามารถสร้างสารพิษ (Toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ในร่างกายมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น

อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-37 องศาเซียลเซียส ไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซียสเซียส และสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.13 *Bacillus cereus* (Spore Forming Bacteria)
ที่มา: www.foodnetworksolution.com, ออนไลน์, 2561

แหล่งที่พบ

พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน น้ำเชื้อสร้างสปอร์ซึ่งทนความแห้งแล้งได้ดี สปอร์จึงพบได้ทั่วไปในฝุ่น ควัน และ ปะปนมากับอาหารแห้ง เช่น น้ำตาล วัตถุเจือปนอาหาร เครื่องเทศ และพบบ่อยในอาหารกลุ่ม แป้ง เมล็ดธัญชาติ(Cereal Grain) เช่น ข้าวหุงสุก เส้นก๋วยเตี๋ยว พาสต้า อาหารกึ่งสำเร็จรูป เช่น ข้าวกึ่งสำเร็จรูป

โรคและอาการของโรค โรคอาหารเป็นพิษ(food poisoning) เกิดจากบาซิลัสซีเรียส ทำให้เกิดอาการ 2 ลักษณะ

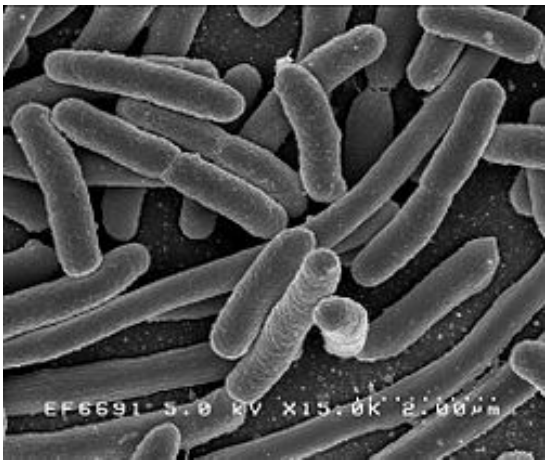
2.10.1 อาการอาเจียน(Emetic syndrome) เกิดจากที่ร่างกายได้รับสารพิษ(Intoxication) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารก่อนที่จะบริโภคเข้าไป สารพิษนี้ทนต่ออุณหภูมิสูงและ ทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ดี ผู้ป่วยจะเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียน ภายหลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไปประมาณ 5 ชั่วโมง โดยทั่วไปอาการเป็นอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง โรคอาหารเป็นพิษลักษณะนี้ มักเรียกว่า Chinese Restaurant Syndrome เนื่องจากมักพบในผู้ป่วยรับประทานอาหารจีน ซึ่งมักเป็นข้าวผัด ที่ทำจากข้าวสุกที่หุงค้างไว้นาน ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและสารพิษทนต่อความร้อน ก่อนนำมาปรุงหรือทำให้ร้อนใหม่

2.10.2 อาการถ่ายเหลว(Diarrhea Syndrome) เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีเซลล์ของแบคทีเรีย และเพิ่มจำนวนในลำไส้ของมนุษย์ ใช้เวลาฟักตัวประมาณ 8-16 ชั่วโมง มีสารพิษเอนเทอโรทอกซิน(Enterotoxin) ที่ไม่ทนต่อความร้อน ทำให้เกิดอาการการปวดท้อง เป็นตะคริวที่

ท้อง และถ่ายอุจจาระเหลว โดยทั่วไปอาการเป็นอยู่ไม่เกิน 14 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรค (Infective dose) 100-100,000 เซลล์ต่อกรัม

2.11 Escherichia coli

Escherichia coli หรือเรียกโดยย่อว่า ***E. coli*** (อี. โคไล) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง เพราะทั้งเด็ก และผู้ใหญ่มักมีภูมิต้านทานอยู่บ้างแล้ว เนื่องจาก ได้รับเชื้อนี้เข้าไปทีละน้อยอยู่เรื่อยๆ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำ หรือ มือของผู้ประกอบอาหาร ปกติเชื้อเหล่านี้อาจพบในอุจจาระได้อยู่แล้วแม้จะไม่มีอาการอะไร มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น พม่า ไทย ลาว กัมพูชา อินโดนีเซีย เป็นต้นถูกค้นพบโดย Theodur Escherich มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแดง เป็นแกรมลบ เป็น Facultative aerobe



ภาพที่ 2.14 *Escherichia coli*
ที่มา: https://th.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli, ออนไลน์, 2561

E. coli ในทางเดินอาหารอาจแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ตามคุณสมบัติทางวิทยาภูมิคุ้มกันและคุณสมบัติในการทำให้เกิดโรค การแบ่งชนิดตามคุณสมบัติที่ทำให้เกิดโรคอาจแบ่งได้ดังนี้

2.11.1 Enterotoxigenic *E. coli*(ETEC) ที่สร้างสารซึ่งเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้ท้องเสีย

2.11.2 Enteropathogenic *E. coli*(EPEC)

2.11.3 Enteroinvasive *E. coli*(EIEC) ซึ่งรุกรานเซลล์เยื่อบุลำไส้ คล้ายโรคบิดจากเชื้อชิเกลลา ทำให้มีไข้สูง ท้องเสียรุนแรง

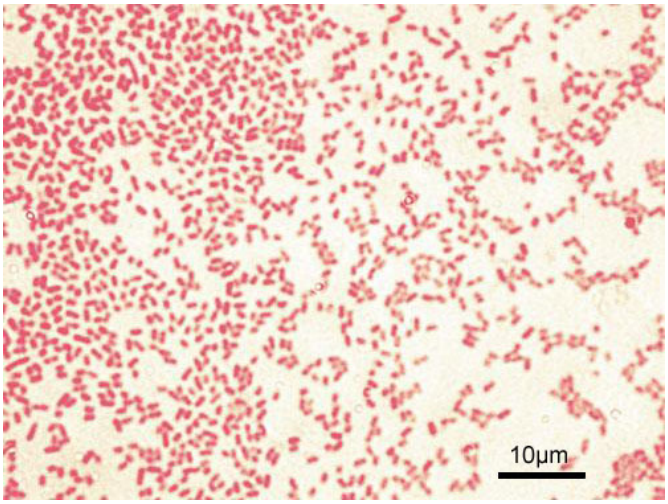
2.11.4 Enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC) ทำให้มีถ่ายเป็นเลือด เชื้อในกลุ่มนี้ที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดคือเชื้อชนิด O157:H7 นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิด Hemolytic-uremic syndrome และไตวายเฉียบพลันได้

2.11.5 Enteroaggregative *E. coli*(EAEC)

2.11.6 Diffuse-adherent *E.coli*(DAEC)

2.12 *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์ รวมทั้งคน พบได้ในดิน น้ำ ผิวหนังและในสภาพแวดล้อมอื่นๆ อยู่ได้ทั้งในสภาพแวดล้อมปกติและสภาพออกซิเจนต่ำ ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ในสัตว์ จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อที่มีภูมิคุ้มกันต่ำลง



ภาพที่ 2.15 การย้อมแกรมของ Pseudomonas aeruginosa (รูปแท่งสีแดงอมชมพู)
ที่มา: https://th.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa, ออนไลน์, 2561

Pseudomonas aeruginosa สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในหลายส่วนของร่างกาย ดังนี้

2.12.1 หัวใจ และกระแสเลือด *Pseudomonas aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับ 4 ในการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือดการติดเชื้อในกระแสเลือดจะเกิดกับผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดและผู้ที่ติดเชื้อ ในบริเวณอื่นของร่างกาย*Pseudomonas aeruginosa* จะมีการติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจในผู้ติดยาที่ฉีดยาเข้าเส้นเลือดดำหรือผู้ที่ใช้ลิ้นหัวใจเทียม

2.12.2 กระดูกและข้อต่อ การติดเชื้อในส่วนนี้อาจเกิดจากการบาดเจ็บหรือมีการแพร่กระจายของเชื้อมาจาก เนื้อเยื่ออื่นหรือการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ติดยาที่ฉีดยาเข้าเส้นเลือดดำ หรือติดเชื้อในกระแสเลือดจะมีความเสี่ยงในการติดเชื้อที่กระดูกและข้อต่อ

2.12.3 ระบบประสาทส่วนกลาง *Pseudomonas aeruginosa* จะทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งอาจเกิดจากการที่สมองได้รับบาดเจ็บจากการผ่าตัด จากการแพร่กระจายจากส่วนของของร่างกาย หรือจากการติดเชื้อในกระแสเลือด

2.12.4 ตาและหู *Pseudomonas aeruginosa* จะก่อให้เกิดการติดเชื้อที่หูส่วนนอกที่เรียกว่า “Swimmer’s Ear” ซึ่งสามารถหายได้เอง แบคทีเรียจะก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในผู้สูงอายุ ซึ่งนำไปสู่ปัญหาด้านการได้ยิน ใบหน้าเป็นอัมพาตหรือเสียชีวิต ส่วนการติดเชื้อที่ตามักเกิดจากการได้รับบาดเจ็บ ซึ่งจะทำให้เกิดรอยแผลเป็นที่กระจกตาซึ่งจะทำให้ตาบอดในที่สุด ปัจจัยที่มีผลในการทำให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อที่ตารวมถึงการใส่ซอฟท์คอนแทคเลนส์ การใช้ยาตาที่มี Corticosteroid มีอาการโคม่า ถูกไฟไหม้รุนแรง หรือรักษาตัวอยู่ในห้อง ICU

2.12.5 ทางเดินปัสสาวะ ติดได้จากการใช้เครื่องทางการแพทย์หรือการผ่าตัด

2.12.6 ปอด ปัจจัยที่มีผลในการทำให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อที่ปอดได้แก่เป็นโรคปอดเรื้อรัง ภูมิคุ้มกันต่ำ ใช้ยาปฏิชีวนะ และผู้ป่วยหัวใจล้มเหลว

2.12.7 ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน คนสุขภาพดีก็สามารถติดเชื้อได้ จากการอาบน้ำหรือเล่นน้ำในสระว่ายน้ำ Hot Tubs ที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ ซึ่งโรคติดเชื้อ Pseudomonas ที่ผิวหนังนี้มักจะเกิดการสับสนกับโรคอีสุกอีใสและจะเกิดอาการรุนแรงได้กับผู้ที่เชื้อในกระแสเลือดร่วมด้วย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับสองในการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในบาดแผลไฟไหม้ในผู้ป่วยที่ พักรักษาตัวที่โรงพยาบาล

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.12.1 วิทยา บุญวรพัฒน์(2554) หนังสือสารานุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้บ่อยในประเทศไทย ได้รายงานฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่ได้จากน้ำต้มของเมล็ดเล็บมือนางมีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าไส้เดือนและปลิงด้วย

2.12.2 Susan และคณะ(2001) ได้รายงานสารต้านมะเร็ง(Anticancer) จากเล็บมือนางมักจะเป็นกลุ่มเดียวกับสารต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant)

2.12.3 วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม(2557) ได้ทดสอบฤทธิ์ในการก่อกลายพันธุ์ ด้วยการสกัดจากผลเล็บมือนาง โดยกำจัด Histidine ออกไปก่อนนำมาทดสอบ และผลการทดลองพบว่าไม่มีผลต่อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ ไม่ว่าจะนำมาสกัดด้วยเมทานอลหรือน้ำร้อน

2.12.4 วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม(2557) ได้ทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าแมลง โดยใช้กิ่งและใบแห้งของเล็บมือนาง นำมาสกัดด้วยน้ำในขนาด 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าไม่มีผลที่จะฆ่าแมลงสาบอเมริกันได้ และแม้ว่าจะใช้ในขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ ก็ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงสาบเยอรมันและแมลงได้

2.12.5 ธีรวุฒิ หวังอำนวยพร และรัชนี ไสยประจง(2550) ได้รายงานพบว่าสารสกัดเอทานอลจากลำต้นเล็บมือนางโดยการวิเคราะห์ด้วย DPPH มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* และพบรายงานการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยสารสกัดเอทานอลจากลำต้นเล็บมือนาง มีผลเป็นบวกคือ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น

2.12.6 มาโนช วามานนท์และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ(2540) ได้ศึกษาทางเภสัชศาสตร์พบว่าเมล็ด (ผล) ของเล็บมือนางมีสารสำคัญคือ Quisqualic acidมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการขับพยาธิและเป็นยาระบาย

2.12.7 Sun และ Ho(2005) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก Buckwheat(Fagopyrum esculentum MÖench) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ Butylated hydroxyanisole(BHA), Butylated hydroxytuluene(BHT) และ Tertiary butylhyroquinone(TBHQ) โดยวิธีที่ใช้คือβ-carotene bleaching assay, 2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) assay และ Rancimat method พบว่า สารสกัดจากเมทานอลจะมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 627±40 ที่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธี β-carotene bleaching

2.12.8 จุฑารัตน์ บุตรรัตน์, ดำรงค์ พงศ์พุทธชาติ และบุษราคัม ทรัพย์อุดมผล(2553) ได้รายงานฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของพืชสมุนไพรไทย โดยนำพืชสมุนไพรไทย 13 ชนิดจากกิ่งและดอกนำมาสกัดด้วยเอทานอล 95% และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเอทานอลจากพืชสมุนไพรไทยทั้งหมดโดยวิธีagar disc diffusion พบว่าสารสกัดจากกิ่งเล็บมือนางสามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella Pneumoniae* ได้ดีที่สุด

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

โครงงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากส่วนใบ ดอกและลำต้นจากเล็บมือนางในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบกับสาร ABTS และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์สบู่เหลวที่ผสมสารสกัดเมื่อเวลาผ่านไป

3.1 ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

เล็บมือนาง(*Quisqualisindica* Linn.) จากอำเภอพระประแดง(จังหวัดสมุทรปราการ) นำส่วนดอกและใบกับก้านอ่อนมาล้างทำความสะอาด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C นำดอกและใบกับก้านอ่อนที่แห้งมาปั่นให้มีขนาดเล็กที่สุด

ภาพที่ 3.1เล็บมือนาง
ที่มา : https://medthai.com/เล็บมือนาง

3.2 เครื่องมือและสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือ

3.2.1.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ยี่ห้อ JUSCO รุ่น V – 650

3.2.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม4 ตำแหน่ง รุ่น Denver instrument SI - 234

3.2.1.3 เครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศ(Rotary Evaporator) ยี่ห้อ BUCHI รุ่นRotavapor 210, Heating Bath B - 491, Vacuum PumpV - 700

3.2.1.4 ชุดกรองสุญญากาศ(Vaccuum Pump)

3.2.1.5 กระบอกตวง(Cylinder)

3.2.1.6 ขวดปริมาตรทรงกรวย(Conical flask)

3.2.1.7 บีกเกอร์(Beaker)

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 เมทานอล(Methanol) เอทานอล(Ethanol) และเฮกเซน(Hexane)

3.2.2.2 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))

3.2.2.3 $K_2S_2O_8$(potassium persulphate)

3.2.2.4 Trolox

3.2.2.5 สารสกัดหยาบเล็บมือนาง(*Quisqualisindica Linn.* Extract)

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1 พืชที่ทำการศึกษา

เล็บมือนาง(*Quisqualisindica Linn.*)

3.3.2 การเก็บตัวอย่างเก็บส่วนใบ ดอกและก้านอ่อนของต้นเล็บมือนางจากอำเภอพระประแดง จังหวัด สมุทรปราการ

3.3.3 การสกัดสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

3.3.3.1 นำพืชที่ทำความสะอาดแล้วมาทำให้แห้งโดยการอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด

3.3.3.2 นำพืชที่บดละเอียด ไปสกัดด้วยตัวทำละลายผสมในอัตราส่วนพืช 25 กรัมต่อตัวทำละลายเอทานอลเมทานอล และเฮกเซน 150 มิลลิลิตร โดยแช่ไว้ 3 วัน

3.3.3.3 กรองสารที่สกัดได้ นำสารที่สกัดได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศ(Rotary evaporator)

3.3.3.4 คำนวณน้ำหนักแห้ง(%yield) ของสารสกัดหยาบ

3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant Activity)

3.4.1 ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay ด้วยเครื่องตรวจวัดยูวี- วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ดังนี้

3.4.1.1 เตรียมสารละลาย ABTS(2, 2 - Azino- bis(3 - ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ผสมกับสารละลาย $K_2S_2O_8$(Potassium persulphate) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์

3.4.1.2 นำสารละลาย ABTS จากข้อ 3.4.1.1 ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นได้สารละลาย ABTSในอัตราส่วน 1 : 4.2(สารละลาย ABTS: น้ำ)

3.4.1.3 นำสารละลายข้อ 3.4.1.2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ถึง0.9 (ถ้าไม่ได้ค่าการดูดกลืนแสงให้นำสารละลายไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น)

3.4.1.4 เตรียมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยเอทานอล (95%) เติมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว 2.0 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่าง 20ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.4.1.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.1.6 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของสารต้านอนุมูลอิสระ(% inhibition)ดังสมการ

$$\%\text{inhibition} = \frac{|A_{734\ control} - A_{734\ testsample}|}{A_{734\ control}} \times 100$$

3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

3.5.1. Anti – *Bacillus cereus*(ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus cereus*)

วิธีการทดสอบ : Reasazurinmicroplate assay(REMA)

Possitive control agent : Vancomycin

Negative control agent : 0.5 % Dimethylsulfoxide(DMSO)

วิธีการ : แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ แบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ ATCC11778(TISTR) โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง tryptic soy agar(TSA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเอาโคโลนีเดี่ยวๆ มาเลี้ยงในอาหารเหลว tryptic soy broth(TSB) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาเจือจางใน 20 mL ของอาหารเหลว TSB นำไปบ่มที่ 37 °C ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมงต่อมานำเซลล์ suspension ที่เลี้ยงได้ มาปรับค่าความขุ่นที่ OD_{600} ให้ได้ค่าประมาณ 0.4 – 0.5(หรือได้ค่าประมาณ 1 x 10^8 CFU/mL)และนำมาเจือจางต่อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ให้ได้ค่าประมาณ 3.53 x 10^5 CFU/mL ก่อนนำไปทดสอบ

ทำการทดสอบใน 384 well plate (ทำ 3 ซ้ำ) โดยใส่ตัวอย่าง 7.5 μL ใส่เซลล์ suspension 42.5 μL และสารละลาย resazurin 25 μL (คือ 0.0625 mg/mL ของresazurin ใน PBS) ในแต่ละหลุม

ทดสอบ ส่วนหลุมทดสอบที่เป็น Blank จะไม่ใส่เซลล์ suspensionนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดด้วย Fluorescence ในสภาวะ excitation และ emission ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ตามลำดับ นำไปคำนวณค่า % Inhibition ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

โดยที่ FU_T = ค่าความขุ่นของสารทดสอบที่วัดด้วยค่า Fluorescence

FU_C = ค่าความขุ่นของสารควบคุมเปรียบเทียบคือ 0.5 % DMSO

% Inhibition $<$ 90 % คือ Inactive

% Inhibition $\geq$ 90 % คือ Active

MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % ขึ้นไป

3.5.2. Anti – *Escherichia coli*(ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli*)

วิธีการทดสอบ : Optical density measurement at 600 nm(OD_{600})

Possitive control agent : Amikacin and ofloxacin

Negative control agent : 0.5 % Dimethylsulfoxide(DMSO) (final concentration)

วิธีการ : แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC25922 โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง tryptic soy agar(TSA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเอาโคโลนีเดี่ยวๆ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำมาเจือจางต่อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth(MHB) ให้ได้ค่าประมาณ 2.5×10^5 CFU/mL ก่อนนำไปทดสอบ

ทำการทดสอบใน 384 well plate (ทำ 3 ซ้ำ) โดยใส่ตัวอย่าง 5 μL(รวมทั้ง positivecontrol และ negative control) แล้วเติมสารละลายเชื้อ(เซลล์ suspension) ที่เตรียมไว้ประมาณ 45 μL ส่วนในหลุมทดสอบที่เป็น Blank ให้เติม 5 μL ของ 5% DMSO แล้วเติม 45 μL ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดการเจริญเติบโต ที่ความยาวคลื่นที่ OD_{600} (600 nm)โดยใช้ Microplate reader คำนวณ % การยับยั้ง % Inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (OD_T / OD_C)] \times 100$$

โดยที่ OD_T = ค่าความขุ่นของสารทดสอบ

OD_C = ค่าความขุ่นของสารควบคุมเปรียบเทียบคือ 0.5 % DMSO

% Inhibition $<$ 90 % คือ Inactive

% Inhibition $\geq$ 90 % คือ Active

MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % ขึ้นไป

3.5.3 Anti – *Pseudomonas aeruginosa*(ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*)

วิธีการทดสอบ : Optical density measurement at 600 nm(OD_{600})

Possitive control agent : Amikacin and ofloxacin

Negative control agent : 0.5 % Dimethylsulfoxide(DMSO) (final concentration)

วิธีการ : แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01(ATCC15692) โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง tryptic soy agar(TSA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(Phosphate buffer saline (PBS)) โดยให้ได้ค่าความขุ่น 0.15 ที่ความยาวคลื่น 600 nm(OD_{600})หรือให้ได้ค่าความขุ่นประมาณ 1 x 10^{7} CFU/mLแล้วนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth(MHB)ให้ได้ค่าความขุ่นประมาณ 2.5 x 10^{5} CFU/mL ก่อนนำไปทดสอบ

ทำการทดสอบใน 384 well plate(ทำ 3 ซ้ำ) โดยใส่ตัวอย่าง 5 μL(รวมทั้ง positivecontrol และ negative control) แล้วเติมสารละลายเชื้อ(เซลล์ suspension) ที่เตรียมไว้ประมาณ 45 μL ส่วนในหลุมทดสอบที่เป็น Blank ให้เติม 5 μL ของ 5% DMSO แล้วเติม 45 μL ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 6 – 7 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดการเจริญเติบโต ที่ความยาวคลื่นที่ OD_{600}(600 nm) โดยใช้ Microplate reader คำนวณ % การยับยั้ง(% Inhibition) ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (OD_T / OD_C)] \times 100$$

โดยที่ OD_T = ค่าความขุ่นของสารทดสอบ

OD_C = ค่าความขุ่นของสารควบคุมเปรียบเทียบคือ 0.5 % DMSO

% Inhibition $<$ 90 % คือ Inactive

% Inhibition $\geq$ 90 % คือ Active

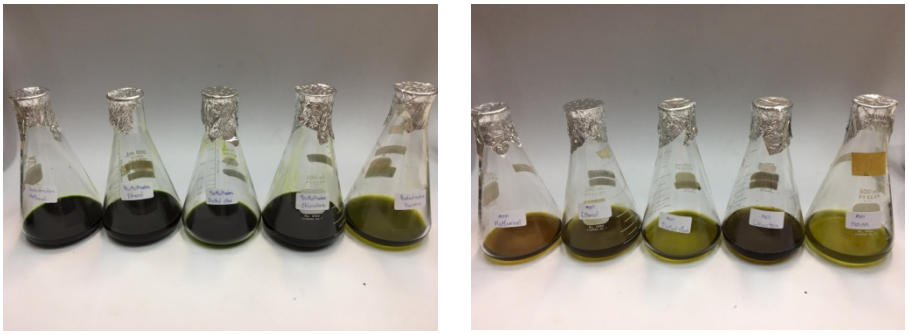
MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % ขึ้นไป

บทที่ 4

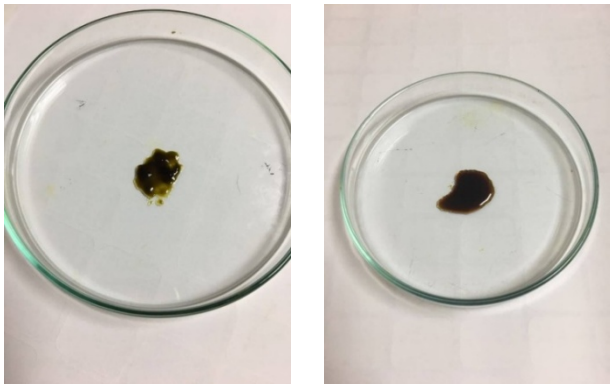
ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางกายภาพของเล็บมือนาง

จากการนำเล็บมือนางที่อบแห้งจากส่วนดอก และใบกับก้านอ่อน มาแช่ในตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ในอัตราส่วนพืช 25 กรัม ต่อตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 93 ยี่ห้อ Whatman ได้สารสีเหลืองและเขียวเข้มตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.1 จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองเข้มของส่วนดอก และสารสีเขียวเข้มหนืดสำหรับใบกับก้านอ่อน แสดงดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.1 สารสกัดหยาบเล็บมือนางที่ได้จากการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 93



ภาพที่ 4.2 สารสกัดหยาบเล็บมือนางที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำ-ละลายระบบสุญญากาศ

4.2 ร้อยละของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

นำดอก และใบกับก้านอ่อนแห้งจำนวน 25 กรัมนำไปแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล ไดเอททิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน อย่างละ 150 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศจะได้น้ำหนักแห้ง ดังตารางที่ 4.1

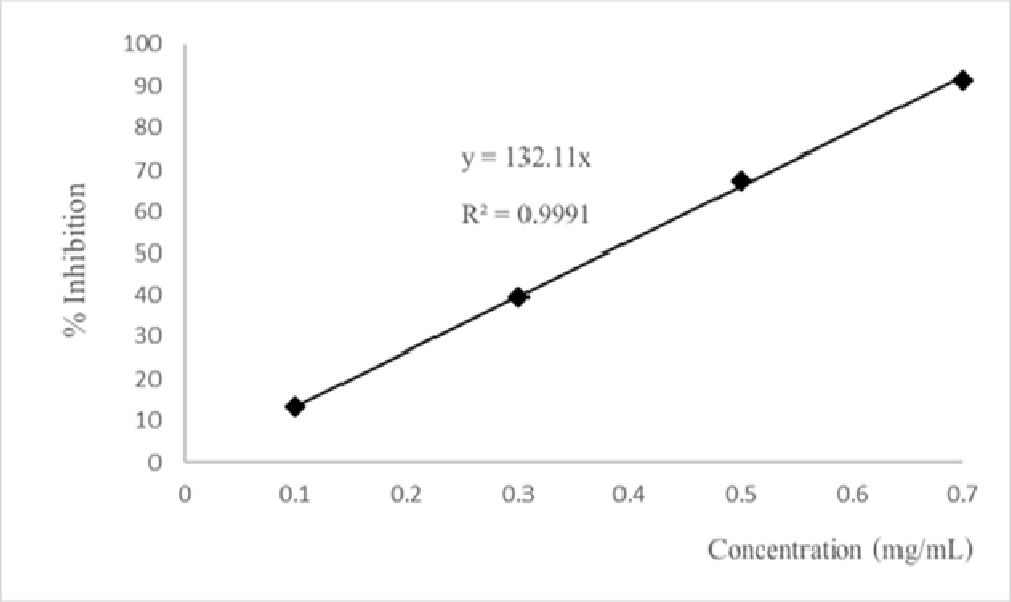
ตารางที่ 4.1 ร้อยละของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง(% yield)(w/w)

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	ระยะเวลาในการแช่ (วัน)	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ(กรัม)				
			ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ขวดที่ 3	เฉลี่ย	% yield
ใบกับก้านอ่อน	เมทานอล	3	1.16	1.15	1.14	1.15	4.60
	เอทานอล		1.29	1.46	1.35	1.37	5.48
	ไดเอทิลอีเทอร์		0.60	0.54	0.55	0.56	2.24
	คลอโรฟอร์ม		0.92	1.12	1.20	1.08	4.32
	เฮกเซน		0.47	0.43	0.38	0.43	1.72
ดอก	เมทานอล		2.17	2.10	2.25	2.17	8.68
	เอทานอล		1.32	1.22	1.12	1.22	4.88
	ไดเอทิลอีเทอร์		0.90	0.96	0.83	0.90	3.60
	คลอโรฟอร์ม		1.23	1.19	0.99	1.14	4.56
	เฮกเซน		0.76	0.80	0.98	0.85	3.40

จากตารางที่ 4.1 พบว่า ร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบ(% yield) ของส่วนใบกับก้านอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลในระยะเวลา 3 วันมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.48 % รองลงมาคือส่วนของใบกับก้านอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ และเฮกเซน คิดเป็นร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบ(% yield) เท่ากับ 4.60, 4.32, 2.24 และ 1.72 %(w/w) ตามลำดับ ส่วนร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบ(% yield) ของส่วนดอกที่สกัดตัวทำละลายเมทานอลในระยะเวลา 3 วันมีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.68 % รองลงมาคือส่วนของดอกที่สกัดด้วย ตัวทำละลายเอทานอล คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ และเฮกเซน คิดเป็นร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบ(% yield) เท่ากับ 4.88, 4.56, 3.60 และ 3.40 %(w/w) ตามลำดับ

4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางด้วยสาร ABTS

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 0.0072 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นสูงสุด(λ_{max}) 734 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสงของ $Abs_{Control}$ เท่ากับ 0.9997 เพื่อนำสารละลาย ABTS ไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ซึ่งแสดงประสิทธิภาพของสารสกัดตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(% inhibition) แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(% inhibition) ในส่วนของใบกับก้านอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 81.78 % คิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 6.11 mg/mL รองลงมาคือส่วนของใบกับก้านอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล คลอโรฟอร์มเฮกเซน และไดเอทิลอีเทอร์ ให้ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(% inhibition) เท่ากับ 63.49, 9.78, 8.23และ 6.46 %(w/w) ตามลำดับ และคิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 7.88, 51.12, 60.75และ77.40 mg/mL ตามลำดับส่วนค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(% inhibition) ในส่วนของดอกที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 98.24 % คิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 5.09 mg/mL รองลงมาคือส่วนของดอกที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ให้ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ(% inhibition) เท่ากับ 77.03, 16.75, 13.14และ 12.15 %(w/w) ตามลำดับ และคิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 6.49, 29.85, 38.05 และ 41.15 mg/mL ตามลำดับ



ภาพที่ 4.3 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางแห้งด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน

ส่วนของพืช	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย 10 mg/mL	ระยะเวลาในการแช่ (วัน)	ครั้งที่ (ขวดที่)					
			1	2	3	เฉลี่ย	% inhibition	IC_{50} (mg/mL)
ใบกับก้านอ่อน	เมทานอล	3	0.3750	0.3620	0.3580	0.3650	63.49	7.88
	เอทานอล		0.2513	0.1723	0.1228	0.1821	81.78	6.11
	ไดเอทิลอีเทอร์		0.9429	0.9378	0.9245	0.9351	6.46	77.40
	คลอโรฟอร์ม		0.9142	0.9000	0.8915	0.9019	9.78	51.12
	เฮกเซน		0.9194	0.9166	0.9162	0.9174	8.23	60.75
ดอก	เมทานอล		0.0179	0.0176	0.0173	0.0176	98.24	5.09
	เอทานอล		0.2547	0.2208	0.2134	0.2296	77.03	6.49
	ไดเอทิลอีเทอร์		0.8369	0.8330	0.8267	0.8322	16.75	29.85
	คลอโรฟอร์ม		0.9884	0.9864	0.9848	0.9865	13.14	38.05
	เฮกเซน		0.8834	0.8809	0.8703	0.8782	12.15	41.15
Trolox	0.1 mg/mL	-	0.8659	0.8681	0.8665	0.8668	13.29	0.38
	0.3 mg/mL		0.6038	0.6031	0.6029	0.6033	39.65	
	0.5 mg/mL		0.3246	0.3255	0.3259	0.3253	67.46	
	0.7 mg/mL		0.0847	0.0861	0.0854	0.0854	91.46	
control	0.9997							

4.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่*Bacillus cereus, Pseudomonasaeruginosa* และ *Escherichia coli* โดยการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง(% Inhibition) ที่พิจารณาจากค่าความขุ่นของสารทดสอบเปรียบเทียบกับค่าความขุ่นของสารควบคุม และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % ขึ้นไป(MIC_{90}) พบว่า ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ ATCC11778(TISTR) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก

ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % แต่สารสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุดคือ 56.36 % เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive Control คือ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 0.313 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B.cereus* ได้ดีที่สุดที่ 106.25 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.313 μg/mL และ Positive Control คือ Vancomycin ที่ความเข้มข้น 4.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. cereus*ได้ดีที่สุดที่ 106.99 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 4.00 μg/mL แสดงดังตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01(ATCC15692) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % แต่สารสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุดคือ 38.98 % เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive Control คือ Amikacin ที่ความเข้มข้น 0.781 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *P.aeruginosa* ได้ดีที่สุดที่ 101.44 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.781 μg/mL และ Positive Control คือ Ofloxacin ที่ความเข้มข้น 0.391 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีที่สุดที่ 99.73 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.391 μg/mL แสดงดังตารางที่ 4.4 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC25922 ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % แต่สารสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุดคือ 38.46 % เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive Control คือ Amikacin ที่ความเข้มข้น 2.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีที่สุดที่ 101.86 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 2.00 μg/mL และ Positive Control คือ Ofloxacin ที่ความเข้มข้น 0.0313 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ดีที่สุดที่ 101.24 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.0313 μg/mL แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus cereus*สายพันธุ์ ATCC11778 (TISTR) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้าน ในตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ดอก			
Hexane (50.00 μg/mL)	56.36	Inactive	-
Hexane (25.00 μg/mL)	23.32	Inactive	-
Hexane (12.50 μg/mL)	2.97	Inactive	-
Hexane (6.25 μg/mL)	-14.69	Inactive	-
Hexane (3.13 μg/mL)	-13.61	Inactive	-
Hexane (1.56 μg/mL)	-14.22	Inactive	-
ดอก			
Diethyl ether (50.00 μg/mL)	-1.46	Inactive	-
Diethyl ether (25.00 μg/mL)	-14.86	Inactive	-
Diethyl ether (12.50 μg/mL)	3.44	Inactive	-
Diethyl ether (6.25 μg/mL)	-9.11	Inactive	-
Diethyl ether (3.13 μg/mL)	-8.84	Inactive	-
Diethyl ether (1.56 μg/mL)	-8.17	Inactive	-
ดอก			
Chloroform (50.00 μg/mL)	46.49	Inactive	-
Chloroform (25.00 μg/mL)	14.46	Inactive	-
Chloroform (12.50 μg/mL)	-0.52	Inactive	-
Chloroform (6.25 μg/mL)	-9.25	Inactive	-
Chloroform (3.13 μg/mL)	-2.73	Inactive	-
Chloroform (1.56 μg/mL)	5.73	Inactive	-
ดอก			
Methanol (50.00 μg/mL)	32.38	Inactive	-
Methanol (25.00 μg/mL)	13.28	Inactive	-
Methanol (12.50 μg/mL)	-4.12	Inactive	-
Methanol (6.25 μg/mL)	-11.86	Inactive	-
Methanol (3.13 μg/mL)	-15.93	Inactive	-
Methanol (1.56 μg/mL)	-13.18	Inactive	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ดอก			
Ethanol (50.00 μg/mL)	16.03	Inactive	-
Ethanol (25.00 μg/mL)	4.94	Inactive	-
Ethanol (12.50 μg/mL)	-11.47	Inactive	-
Ethanol (6.25 μg/mL)	-11.93	Inactive	-
Ethanol (3.13 μg/mL)	-10.75	Inactive	-
Ethanol (1.56 μg/mL)	-6.35	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Hexane (50.00 μg/mL)	9.22	Inactive	-
Hexane (25.00 μg/mL)	-13.41	Inactive	-
Hexane (12.50 μg/mL)	-13.01	Inactive	-
Hexane (6.25 μg/mL)	-9.78	Inactive	-
Hexane (3.13 μg/mL)	-8.31	Inactive	-
Hexane (1.56 μg/mL)	-5.15	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Diethyl ether (50.00 μg/mL)	-9.99	Inactive	-
Diethyl ether (25.00 μg/mL)	-16.03	Inactive	-
Diethyl ether (12.50 μg/mL)	-15.76	Inactive	-
Diethyl ether (6.25 μg/mL)	-14.82	Inactive	-
Diethyl ether (3.13 μg/mL)	-10.52	Inactive	-
Diethyl ether (1.56 μg/mL)	5.32	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Chloroform (50.00 μg/mL)	-18.65	Inactive	-
Chloroform (25.00 μg/mL)	-15.16	Inactive	-
Chloroform (12.50 μg/mL)	-17.71	Inactive	-
Chloroform (6.25 μg/mL)	-13.34	Inactive	-
Chloroform (3.13 μg/mL)	-11.46	Inactive	-
Chloroform (1.56 μg/mL)	-9.85	Inactive	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ใบกับก้านอ่อน			
Methanol (50.00 μg/mL)	-11.40	Inactive	-
Methanol (25.00 μg/mL)	-6.88	Inactive	-
Methanol (12.50 μg/mL)	-6.61	Inactive	-
Methanol (6.25 μg/mL)	-6.15	Inactive	-
Methanol (3.13 μg/mL)	-3.53	Inactive	-
Methanol (1.56 μg/mL)	11.96	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Ethanol (50.00 μg/mL)	10.00	Inactive	-
Ethanol (25.00 μg/mL)	-0.31	Inactive	-
Ethanol (12.50 μg/mL)	-2.28	Inactive	-
Ethanol (6.25 μg/mL)	-1.23	Inactive	-
Ethanol (3.13 μg/mL)	-2.74	Inactive	-
Ethanol (1.56 μg/mL)	-2..81	Inactive	-
Positive Control 1			
Rifampicin (2.50 μg/mL)	106.59	Active	
Rifampicin (1.25 μg/mL)	106.45	Active	
Rifampicin (0.625 μg/mL)	106.72	Active	
Rifampicin (0.313 μg/mL)	106.25	Active	0.313
Rifampicin (0.156 μg/mL)	6.13	Inactive	-
Rifampicin (0.0781 μg/mL)	-0.451	Inactive	-
Positive Control 2			
Vancomycin (8.00 μg/mL)	106.18	Active	
Vancomycin (4.00 μg/mL)	106.99	Active	4.00
Vancomycin (2.00 μg/mL)	28.96	Inactive	-
Vancomycin (1.00 μg/mL)	5.12	Inactive	-
Vancomycin (0.50 μg/mL)	-3.14	Inactive	-
Vancomycin (0.25 μg/mL)	-1.86	Inactive	-

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01(ATCC15692) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลาย เอทานอล เมทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ดอก			
Hexane (50.00 μg/mL)	33.13	Inactive	-
Hexane (25.00 μg/mL)	21.59	Inactive	-
Hexane (12.50 μg/mL)	14.66	Inactive	-
Hexane (6.25 μg/mL)	13.17	Inactive	-
Hexane (3.13 μg/mL)	7.73	Inactive	-
Hexane (1.56 μg/mL)	7.58	Inactive	-
ดอก			
Diethyl ether (50.00 μg/mL)	23.15	Inactive	-
Diethyl ether (25.00 μg/mL)	17.42	Inactive	-
Diethyl ether (12.50 μg/mL)	16.67	Inactive	-
Diethyl ether (6.25 μg/mL)	5.50	Inactive	-
Diethyl ether (3.13 μg/mL)	-0.77	Inactive	-
Diethyl ether (1.56 μg/mL)	-1.43	Inactive	-
ดอก			
Chloroform (50.00 μg/mL)	32.69	Inactive	-
Chloroform (25.00 μg/mL)	16.67	Inactive	-
Chloroform (12.50 μg/mL)	13.17	Inactive	-
Chloroform (6.25 μg/mL)	13.32	Inactive	-
Chloroform (3.13 μg/mL)	13.62	Inactive	-
Chloroform (1.56 μg/mL)	14.14	Inactive	-
ดอก			
Methanol (50.00 μg/mL)	38.98	Inactive	-
Methanol (25.00 μg/mL)	31.63	Inactive	-
Methanol (12.50 μg/mL)	23.42	Inactive	-
Methanol (6.25 μg/mL)	11.15	Inactive	-
Methanol (3.13 μg/mL)	7.87	Inactive	-
Methanol (1.56 μg/mL)	5.68	Inactive	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ดอก			
Ethanol (50.00 μg/mL)	28.50	Inactive	-
Ethanol (25.00 μg/mL)	22.25	Inactive	-
Ethanol (12.50 μg/mL)	12.01	Inactive	-
Ethanol (6.25 μg/mL)	1.69	Inactive	-
Ethanol (3.13 μg/mL)	3.88	Inactive	-
Ethanol (1.56 μg/mL)	0.84	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Hexane (50.00 μg / mL)	-10.27	Inactive	-
Hexane (25.00 μg / mL)	-0.17	Inactive	-
Hexane (12.50 μg / mL)	-8.36	Inactive	-
Hexane (6.25 μg / mL)	-5.00	Inactive	-
Hexane (3.13 μg / mL)	-13.50	Inactive	-
Hexane (1.56 μg / mL)	-6.64	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Diethyl ether (50.00 μg/mL)	34.77	Inactive	-
Diethyl ether (25.00 μg/mL)	4.08	Inactive	-
Diethyl ether (12.50 μg/mL)	-7.24	Inactive	-
Diethyl ether (6.25 μg/mL)	0.95	Inactive	-
Diethyl ether (3.13 μg/mL)	7.29	Inactive	-
Diethyl ether (1.56 μg/mL)	-3.74	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Chloroform (50.00 μg/mL)	9.41	Inactive	-
Chloroform (25.00 μg/mL)	-3.66	Inactive	-
Chloroform (12.50 μg/mL)	-10.70	Inactive	-
Chloroform (6.25 μg/mL)	-10.93	Inactive	-
Chloroform (3.13 μg/mL)	-8.13	Inactive	-
Chloroform (1.56 μg/mL)	-2.70	Inactive	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ใบกับก้านอ่อน			
Chloroform (50.00 μg/mL)	9.41	Inactive	-
Chloroform (25.00 μg/mL)	-3.66	Inactive	-
Chloroform (12.50 μg/mL)	-10.70	Inactive	-
Chloroform (6.25 μg/mL)	-10.93	Inactive	-
Chloroform (3.13 μg/mL)	-8.13	Inactive	-
Chloroform (1.56 μg/mL)	-2.70	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Methanol (50.00 μg/mL)	25.14	Inactive	-
Methanol (25.00 μg/mL)	7.32	Inactive	-
Methanol (12.50 μg/mL)	4.19	Inactive	-
Methanol (6.25 μg/mL)	4.19	Inactive	-
Methanol (3.13 μg/mL)	7.79	Inactive	-
Methanol (1.56 μg/mL)	7.24	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Ethanol (50.00 μg/mL)	4.19	Inactive	-
Ethanol (25.00 μg/mL)	3.88	Inactive	-
Ethanol (12.50 μg/mL)	5.29	Inactive	-
Ethanol (6.25 μg/mL)	1.85	Inactive	-
Ethanol (3.13 μg/mL)	2.16	Inactive	-
Ethanol (1.56 μg/mL)	2.94	Inactive	-
Positive Control 1			
Amikacin (3.13 μg/mL)	102.48	Active	
Amikacin (1.56 μg/mL)	102.19	Active	
Amikacin (0.781 μg/mL)	101.44	Active	0.781
Amikacin (0.391 μg/mL)	81.10	Inactive	-
Amikacin (0.195 μg/mL)	33.43	Inactive	-
Amikacin (0.0977 μg/mL)	17.64	Inactive	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
Positive Control 2			
Ofloxacin (3.13 μg/mL)	102.33	Active	
Ofloxacin (1.56 μg/mL)	102.11	Active	
Ofloxacin (0.781 μg/mL)	102.56	Active	
Ofloxacin (0.391 μg/mL)	99.73	Active	0.391
Ofloxacin (0.195 μg/mL)	82.93	Inactive	-
Ofloxacin (0.0977 μg/mL)	37.38	Inactive	-

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC25922 ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ดอก			
Hexane (50.00 μg/mL)	-3.79	Inactive	-
Hexane (25.00 μg/mL)	-12.29	Inactive	-
Hexane (12.50 μg/mL)	-15.64	Inactive	-
Hexane (6.25 μg/mL)	-18.01	Inactive	-
Hexane (3.13 μg/mL)	-14.35	Inactive	-
Hexane (1.56 μg/mL)	-5.22	Inactive	-
ดอก			
Diethyl ether (50.00 μg/mL)	-15.92	Inactive	-
Diethyl ether (25.00 μg/mL)	-15.18	Inactive	-
Diethyl ether (12.50 μg/mL)	-21.80	Inactive	-
Diethyl ether (6.25 μg/mL)	-21.00	Inactive	-
Diethyl ether (3.13 μg/mL)	-8.70	Inactive	-
Diethyl ether (1.56 μg/mL)	-5.88	Inactive	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ดอก			
Chloroform (50.00 μg/mL)	-12.57	Inactive	-
Chloroform (25.00 μg/mL)	-9.16	Inactive	-
Chloroform (12.50 μg/mL)	-10.79	Inactive	-
Chloroform (6.25 μg/mL)	-10.41	Inactive	-
Chloroform (3.13 μg/mL)	-8.08	Inactive	-
Chloroform (1.56 μg/mL)	-5.50	Inactive	-
ดอก			
Methanol (50.00 μg/mL)	38.46	Inactive	-
Methanol (25.00 μg/mL)	14.63	Inactive	-
Methanol (12.50 μg/mL)	-15.69	Inactive	-
Methanol (6.25 μg/mL)	-14.75	Inactive	-
Methanol (3.13 μg/mL)	-16.75	Inactive	-
Methanol (1.56 μg/mL)	-6.84	Inactive	-
ดอก			
Ethanol (50.00 μg/mL)	19.90	Inactive	-
Ethanol (25.00 μg/mL)	-13.27	Inactive	-
Ethanol (12.50 μg/mL)	-18.64	Inactive	-
Ethanol (6.25 μg/mL)	-10.70	Inactive	-
Ethanol (3.13 μg/mL)	-3.27	Inactive	-
Ethanol (1.56 μg/mL)	-4.33	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Hexane (50.00 μg/mL)	-25.55	Inactive	-
Hexane (25.00 μg/mL)	-26.44	Inactive	-
Hexane (12.50 μg/mL)	-21.93	Inactive	-
Hexane (6.25 μg/mL)	-15.87	Inactive	-
Hexane (3.13 μg/mL)	-15.21	Inactive	-
Hexane (1.56 μg/mL)	-10.63	Inactive	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
ใบกับก้านอ่อน			
Diethyl ether (50.00 μg/mL)	-27.51	Inactive	-
Diethyl ether (25.00 μg/mL)	-30.81	Inactive	-
Diethyl ether (12.50 μg/mL)	-26.68	Inactive	-
Diethyl ether (6.25 μg/mL)	-22.87	Inactive	-
Diethyl ether (3.13 μg/mL)	-16.21	Inactive	-
Diethyl ether (1.56 μg/mL)	-8.35	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Chloroform (50.00 μg/mL)	-14.03	Inactive	-
Chloroform (25.00 μg/mL)	-20.13	Inactive	-
Chloroform (12.50 μg/mL)	-16.84	Inactive	-
Chloroform (6.25 μg/mL)	-19.19	Inactive	-
Chloroform (3.13 μg/mL)	-14.41	Inactive	-
Chloroform (1.56 μg/mL)	-5.75	Inactive	-
ใบกับก้าน			
Methanol (50.00 μg/mL)	-10.70	Inactive	-
Methanol (25.00 μg/mL)	-2.40	Inactive	-
Methanol (12.50 μg/mL)	-3.07	Inactive	-
Methanol (6.25 μg/mL)	-0.67	Inactive	-
Methanol (3.13 μg/mL)	1.45	Inactive	-
Methanol (1.56 μg/mL)	0.63	Inactive	-
ใบกับก้านอ่อน			
Ethanol (50.00 μg/mL)	-4.17	Inactive	-
Ethanol (25.00 μg/mL)	-3.42	Inactive	-
Ethanol (12.50 μg/mL)	-4.84	Inactive	-
Ethanol (6.25 μg/mL)	-3.38	Inactive	-
Ethanol (3.13 μg/mL)	-2.36	Inactive	-
Ethanol (1.56 μg/mL)	0.23	Inactive	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ตัวอย่าง	% Inhibition	Activity	MIC_{90} (μg/mL)
Positive Control 1			
Amikacin (8.00 μg/mL)	101.76	Active	
Amikacin (4.00 μg/mL)	101.76	Active	
Amikacin (2.00 μg/mL)	101.86	Active	2.00
Amikacin (1.00 μg/mL)	53.47	Inactive	-
Amikacin (0.50 μg/mL)	46.57	Inactive	-
Amikacin (0.25 μg/mL)	24.59	Inactive	-
Positive Control 2			
Ofloxacin (0.1250 μg/mL)	103.01	Active	
Ofloxacin (0.0625 μg/mL)	102.91	Active	
Ofloxacin (0.0313 μg/mL)	101.24	Active	0.0313
Ofloxacin (0.0156 μg/mL)	40.44	Inactive	-
Ofloxacin (0.0078 μg/mL)	3.89	Inactive	-
Ofloxacin (0.0039 μg/mL)	4.31	Inactive	-

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลโครงการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเล็บมือนางส่วนใบและลำต้นโดยวิธี ABTS assay ด้วยเครื่องตรวจวัดยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากผลการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1 สรุปผลการศึกษา

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาโดยการนำเล็บมือนางที่อบแห้งแล้วบดให้ละเอียดจากส่วนดอกและส่วนใบกับก้านอ่อน มาแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ในอัตราส่วนพืช 25 กรัม ต่อตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 93 ยี่ห้อ Whatman พบว่า ส่วนดอกได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองและส่วนใบกับก้านอ่อนได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของเหลวเขียวเข้ม นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองเข้มจากดอก และสีเขียวเข้มสำหรับใบกับก้านอ่อน นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปคำนวณร้อยละของสารสกัด ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียดังนี้

5.1.1 ร้อยละของสารสกัดหยาบ(% yield)

ผลการคำนวณค่าร้อยละของสารสกัดหยาบส่วนใบกับก้านอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเป็นเวลา 3 วันมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.48 % และสารสกัดหยาบส่วนดอกที่สกัดด้วย ตัวทำละลายเมทานอลเป็นเวลา 3 วันมีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.68 %

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางด้วยวิธี ABTS

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนใบกับก้านอ่อนที่สกัดตัวทำละลายเอทานอลเป็นเวลา 3 วันมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 81.78 % คิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 6.11 mg/mL และสารสกัดหยาบส่วนของดอกที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เป็นเวลา 3 วัน มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 98.24 % คิดเป็นค่า IC_{50}เท่ากับ 5.09 mg/mL

5.1.3 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

5.1.3.1 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ ATCC11778 (TISTR)

ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ ATCC11778(TISTR) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอกและส่วนใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % แต่สารสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุดคือ 56.36 % เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive Control คือ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 0.313 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B.cereus* ได้ดีที่สุดที่ 106.25 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.313 μg/mL และ Positive Control คือ Vancomycinที่ความเข้มข้น 4.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B.cereus* ได้ดีที่สุดที่ 106.99 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 4.00 μg/mL

5.1.3.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์PA01(ATCC15692)

ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์PA01(ATCC15692) ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก และส่วนใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % แต่สารสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุดคือ 38.98 % เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive Control คือ Amikacin ที่ความเข้มข้น 0.781 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *P.aeruginosa* ได้ดีที่สุดที่ 101.44 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.781 μg/mL และ Positive Control คือ Ofloxacin ที่ความเข้มข้น 0.391 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีที่สุดที่ 99.73 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.391 μg/mL

5.1.3.3 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC25922

ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ ATCC25922 ของสารสกัดหยาบเล็บมือนางส่วนดอก ใบกับก้านอ่อน ในตัวทำละลายเฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 % แต่สารสกัดหยาบ เฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สูงสุดคือ 38.46 % เมื่อเปรียบเทียบกับ Positive Control คือ Amikacin ที่ความเข้มข้น 2.00 μg/mLสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีที่สุดที่ 101.86 %

คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 2.00 μg/mL และ Positive Control คือ Ofloxacin ที่ความเข้มข้น 0.0313 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ดีที่สุดที่ 101.24 % คิดเป็นค่า MIC_{90} ได้เท่ากับ 0.0313 μg/mL

5.2 อภิปรายผลโครงการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนใบกับก้านอ่อนที่สกัดตัวทำละลายเอทานอล เป็นเวลา 3 วันมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 81.78 % คิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 6.11 mg/mL และสารสกัดหยาบส่วนของดอกที่สกัดด้วยตัว ทำละลายเมทานอล เป็นเวลา 3 วันมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 98.24 % คิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 5.09 mg/mL อาจเป็นผลของสารสำคัญที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในส่วนของดอกที่สกัดด้วยสารละลายมีขั้วสูงมาก ส่วนเอทานอลมีขั้วต่ำกว่าจึงสกัดสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระออกมาได้น้อยกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกับเฮกเซนซึ่งมีขั้วต่ำที่สุด พบว่า สามารถสกัดสารสกัดหยาบออกมาได้ปริมาณน้อยที่สุด และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเล็บมือนางสอดคล้องกับงานวิจัยของ ดวงสุรีย์ แสนสีระ และคณะ, 2559 ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยส่วนลำต้นกับใบ และส่วนดอกของต้นเล็บมือนาง พบว่า น้ำมันหอมระเหยส่วนลำต้นกับใบและส่วนดอกของต้นเล็บมือนางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 56.25 และ 75.00 mg/mL ตามลำดับ ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่ได้โดย GC-MS พบว่ามีสารประกอบที่สำคัญคือ ส่วนของใบและลำต้นพบ Squalene, Gamma-Tocopherol, Vitamin E และส่วนของดอกพบ Kaur-16-ene, Linoleic acid ethyl ester, Ethyl oleate, Vitamin E ตามลำดับ โดยสาร Gamma-Tocopherol และ Vitamin E มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ ATCC11778(TISTR) ได้สูงสุดเท่ากับ 56.36 % แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 %(MIC_{90}) แสดงว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 50 %(MIC_{50})

5.3 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง มีส่วนประกอบของสารหลายชนิดจึงส่งผลให้ค่าคงที่ของสารต้านอนุมูลอิสระเกิดการคลาดเคลื่อนได้ดังนั้นหากต้องการทดสอบที่มีความแม่นยำมากกว่านี้ อาจต้องทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์

ทางโครงสร้างที่แน่นอน โดยนำเฉพาะสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อจะได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้นต่อไป

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50.00 μg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ ATCC11778(TISTR) ได้สูงสุดเท่ากับ 56.36 % แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 90 %(MIC_{90}) แสดงว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 50 %(MIC_{50}) ถือว่าเป็นที่ยอมรับได้ในระดับความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ 50 %

บรรณานุกรม

กฤตติญารัตน์ สมวงศ์ และชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา. (2555). ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของสารสกัดสมุนไพรไทยพื้นบ้านบางชนิดเพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย.**The4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 "Pharmacy Profession in Harmony"**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น,125-134.

การสกัดด้วยตัวทำละลาย, (ม.ป.ป.).[ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ 25 กุมภาพันธ์, 2558. จาก http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter8.pdf

กลีเซอรีนคืออะไร? ทำมาจากอะไร? และใช้ทำอะไร? [ออนไลน์]. [อ้างถึง 25 มกราคม 2018]. Available at: http://www.siamsoap.net/article/61/กลีเซอรีนคืออะไร-ทำมาจากอะไร-และใช้ทำอะไร

เกี่ยวกับแคโรทีนอยด์ - Carotenoids group [ออนไลน์]. [อ้างถึง 15 เมษายน 2017]. Available at: https://sites.google.com/a/kku.ac.th/carotenoids-kku/home/keiyw-kab-khae-ro-thi-nxyd

จิราภรณ์ บุราคร และเรือนแก้ว ประพฤติ. (2555). ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.**วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก.**10(1), 11-22

จุฑารัตน์ บุตรรัตน์, ดำรงค์ พงศ์พุทธชาติและบุษราคัม ทรัพย์อุดมผล. 2553.**ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของพืชสมุนไพรไทย**. หน้า 39-40.

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

เดชา ศิริภัทร. (2543). นิตยสารหมอชาวบ้าน.**เล็บมือนาง** : ไม้เถาดอกหอม กลีบงามจากวรรณคดีไทย,252.

ดวงสุรีย์ แสนสีระ, ผศ.ดร.วิเชียรกีรตินิจกาลและพันทิวา พริ้งเพราะ. 2559. รายงานวิจัย เรื่อง องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งของน้ำมันหอมระเหยจากเล็บมือนาง. โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ งบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ.

เต็ม สมิตินันทน์. (2549). **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.** สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์.(2556). **อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.**วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.21(3), 275-286

เมทานอลเอทานอล และเฮกเซน ใน: วิกิพีเดีย. [ออนไลน์]. [อ้างถึง 25 มกราคม 2018]. Available at: https://th.wikipedia.org/wiki/เมทานอล

วิตามินอีและ trolox.[ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_byval/ag_16_in_1.2.7_99(2559).pdf[2 มกราคม 2018].

วิทยา บุญวรพัฒน์. (2554). หนังสือสารานุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้บ่อยในประเทศไทย. “**เล็บมือนาง**”. หน้า 502.

วิภาดา กันทยศและยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา.(ม.ป.ป.). (2554). **ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณเคอร์คูมินอยด์รวมในพืชสกุลขิงที่พบในประเทศไทย.** ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และ พัชรี บุญศิริ. 2542. “**โปรออกซิแดนท์ อีกโฉมหน้าของแอนติออกซิแดนท์**”. วารสารวิทยาศาสตร์, 42 :196-198.

สถาบันการแพทย์ไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้. “ไช้กุงจื้อ”.**สารที่มีฤทธิ์ขับพยาธิ**. [ออนไลน์]. [อ้างถึง 1 เมษายน 2017]. Available at: tcm.dtam.moph.go.th.

สบู่ และวิธีการทำสบู่, (ม.ป.ป.)**.**สืบค้นเมื่อ 27 กุมภาพันธ์, 2558, จาก http://www.siamchemi.com/สบู่

สมฤดี สังขาวและคณะ. (2560). **การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสบู่.** สักทอง : วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 121.

สรรพคุณและประโยชน์ของต้นเล็บมือนาง! [ออนไลน์]. MedThai. 2014 [อ้างถึง 5 เมษายน2017]. Available at: https://medthai.com/เล็บมือนาง/.

สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด, สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. **“เล็บมือนาง”**. [ออนไลน์]. [อ้างอิง 12 มี.ค. 2016]. Available at: www.rspg.or.th/plants_data/herbs/.

หลักการ uv-vis spectrophotometer. [ออนไลน์]. [อ้างถึง 7 มกราคม 2018]. Available at: http://glasswarechemical.com/scientific-instrument/หลักการ-uv-vis-spectrophotometer/

โอภาวัชระคุปต์, ปรีชาบุญจง, จันทนาบุญยะรัตน์และมาลีรักษ์อัตต์สินทอง. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ.**กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์

ABTS. ใน: วิกิพีเดีย. [ออนไลน์]. 2013 [อ้างถึง 2 มกราคม 2018]. Available at: https://th.wikipedia.org/wiki/ABTS.

Burton, G.W. and Traber, M.G. (1990). "**Vitamin E antioxidant activity biokineties and bioavailability**". Annual Review of Nutrition. 10: 357-382.

Frankel, E. N. et al. 1998. "**Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins**". Journal of the American Oil Chemists' Society46: 834-838.

Fruits Cider Club. **ฟลาโวนอยด์.** [ออนไลน์]. [อ้างถึง 15 เมษายน 2017]. Available at: https://www.facebook.com/FruitsCiderClub/photos/a.4534840780

Garces, J. 2006. **Oxidation.** [ออนไลน์]. [อ้างถึง 5 เมษายน 2017]. Available at: http://www.kangenwaterreport.com/what-isredox/.

Halliwell, B. (1999). "**Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end.**" Society forFree Radical Biology and Medicine 31: 261-272.

Puerta, T. (1999). "**Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil**". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 57: 445-449.

Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. (1992). "**Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids**". Annals of the New York Academy of sciences. 368: 7-19.

Sun, T., and Ho, C.T. 2005.**Antioxidant activities of buckwheat extracts.**Food Chemistry. 90: 743-749.

Susan Poindexter, Linda Clair, and Karen West. Diet and Chronic Didseases.**In ACSM Resource Manual for Guidelines for Exercise Testing and Prescription**. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2001.

Valacchi, G. et al. (2004). "**In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses inmurine lung and skin**". Free Radical Biology and Medicine 36: 673-681.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ก.1 การคำนวณ

ก.1.1 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition)

ตัวอย่าง หาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) ของสารสกัดหยาบใบกับก้านอ่อนเล็บมือนาง ระยะเวลาในการแช่ 3 วัน ในตัวทำละลายเอทานอล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.18231 จะมีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) อยู่เท่าไร กำหนดค่าควบคุม ($Abs_{control}$ = 0.9997)

$$\%inhibition = \frac{|A_{734\ control} - A_{734\ testsample}|}{A_{734\ control}} \times 100$$

$$= \frac{|0.9997 - 0.18213|}{0.9997} \times 100$$

∴ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ = 81.78เปอร์เซ็นต์

ก.1.2 ร้อยละของสารสกัดหยาบเล็บมือนาง(% yield)(w/w)

ตัวอย่าง ใบกับก้านอ่อนเล็บมือนางที่สกัดในตัวทำละลายเอทานอล น้ำหนักพืชที่สกัดได้เฉลี่ย1.37 กรัม หาร้อยละผลผลิตโดยมวลสารสกัดหยาบใบกับก้านอ่อนเล็บมือนาง (น้ำหนักแห้งของใบกับก้านอ่อนเล็บมือนาง = 25 กรัม)

$$\%\ yield = \frac{\text{น้ำหนักพืชที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักแห้งพืชที่ใช้สกัด}} \times 100$$

$$= \frac{1.37}{25} \times 100$$

∴ ร้อยละของสารสกัดหยาบใบกับก้านอ่อนเล็บมือนาง = 5.48เปอร์เซ็นต์

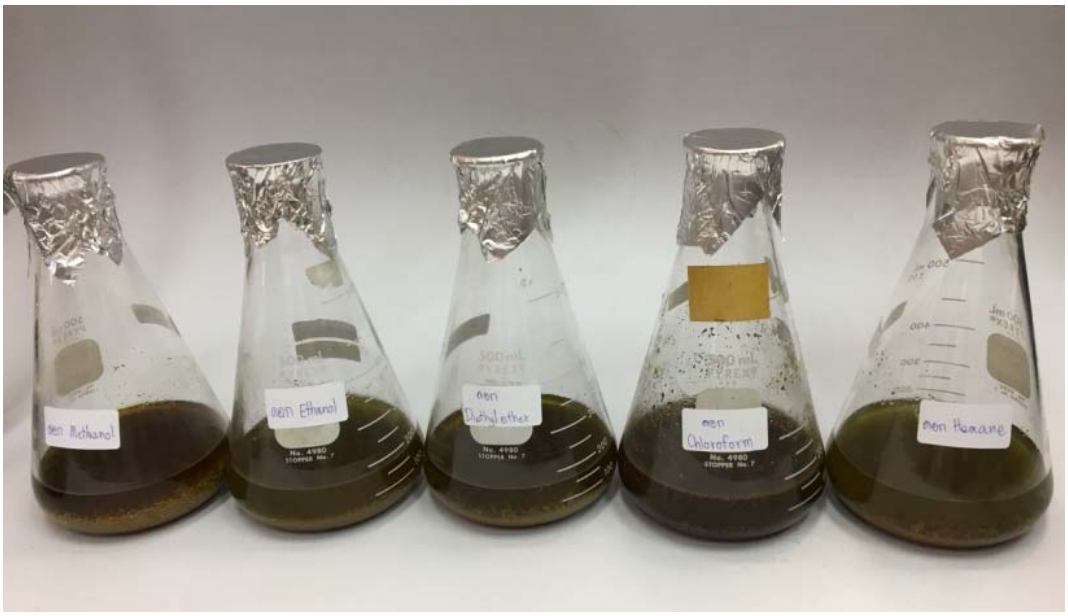
ภาคผนวก ข

ภาพที่ 6.1 ดอกเล็บมือนาง

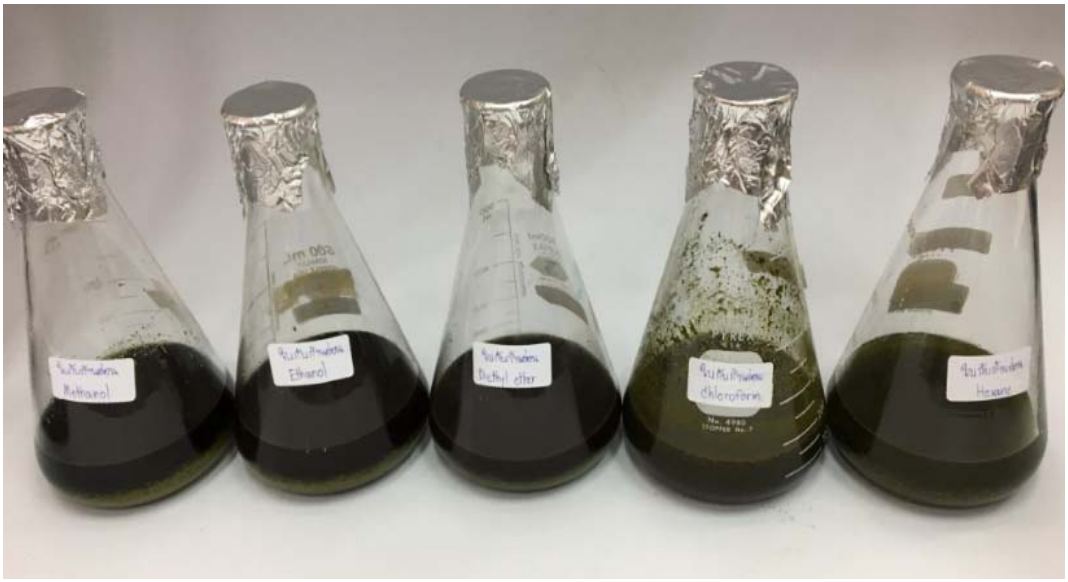
ภาพที่ 6.2 ใบกับก้านอ่อนเล็บมือนาง

ภาพที่ 6.3 ดอกเล็บมือนางปั่นแห้ง

ภาพที่ 6.4 ใบกับก้านอ่อนเล็บมือนางปั่นแห้ง



ภาพที่ 6.5 ชั่งดอกที่ปั่นละเอียดบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ปริมาณขวดละ 25 กรัมต่อตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร



ภาพที่ 6.6 ชั่งใบกับก้านอ่อนที่ปั่นละเอียดบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ปริมาณขวดละ 25 กรัมต่อตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุภัทร ตางาม

งานวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

การศึกษา กศ.ม. ชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม
ค.บ. ชีววิทยา วิทยาลัยครูเทพสตรี ลพบุรี

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาชีววิทยา
ภาควิชาวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
2 ถนนนางลิ้นจี่ ทุ่งมหาเมฆ
สาทร กรุงเทพมหานคร 10120
โทร. 0 2287 9600

ชื่อ นางสาวดวงสุรีย์ แสนสีระ

งานวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

การศึกษา

วท.ด. เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วท.บ. เกษตรศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถานที่ติดต่อ

สาขาวิชาชีววิทยา
ภาควิชาวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
2 ถนนนางลิ้นจี่ ทุ่งมหาเมฆ
สาทร กรุงเทพมหานคร 10120
โทร. 0 2287 9600

ชื่อ นายบุญชัย ด้วงสวัสดิ์

งานวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

การศึกษา วท.บ. เคมีวิเคราะห์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล
วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพ

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
2 ถนนนางลิ้นจี่ ทุ่งมหาเมฆ
สาทร กรุงเทพมหานคร 10120
โทร. 0 2287 9600

ชื่อ นายสุรวิทย์ นันทการัตน์

งานวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

การศึกษา วท.ด. เทคโนโลยีทางภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ค.อ.ม. ครุศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วท.บ. เทคโนโลยีการพิมพ์ ศูนย์กลางสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาเทคโนโลยีการพิมพ์
ภาควิชาเทคโนโลยีสื่อสารและอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
2 ถนนนางลิ้นจี่ ทุ่งมหาเมฆ
สาทร กรุงเทพมหานคร 10120
โทร. 0 2287 9600

ชื่อ นางสาวอนัญญา ไทยบุญนาค

งานวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

การศึกษา ค.อ.ม. เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ค.อ.บ. ออกแบบผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตโชติเวช

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาเทคโนโลยีการพิมพ์
ภาควิชาเทคโนโลยีสื่อสารและอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
2 ถนนนางลิ้นจี่ ทุ่งมหาเมฆ
สาทร กรุงเทพมหานคร 10120
โทร. 0 2287 9600

ชื่อ นางสาวสุวรรณา รุ่งเรือง

งานวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบเล็บมือนาง

การศึกษา ทล.บ. เทคโนโลยีการพิมพ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาเทคโนโลยีการพิมพ์
ภาควิชาเทคโนโลยีสื่อสารและอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
2 ถนนนางลิ้นจี่ ทุ่งมหาเมฆ
สาทร กรุงเทพมหานคร 10120
โทร. 0 2287 9600