การวิเคราะห์สารพฤกษเคมี การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *DIOSPYROS DECANDRA* LOUR. CRUDE EXTRACT

ธีรพล สดไธสง

พรรษณมน สุระฉิมพลี

ลำดวน คำเสียง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *DIOSPYROS DECANDRA* LOUR. CRUDE EXTRACT

THEERAPHOL SODTHAISONG
PHATSANAMON SURACHIMPLEE
LAMDUAN KHAMSIANG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FORTHE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การวิเคราะห์สารพฤกษเคมี การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน Phytochemical analysis, antioxidant and cytotoxic activity of *Diospyros decandra* lour. crude extract
ชื่อนักศึกษา	นายธีรพล สดไธสง นางสาวพรรษณมน สุระฉิมพลี นางสาวลำดวน คำเสียง
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ (ประธานกรรมการ)	
ผศ.ลินจง สุขลำภู (กรรมการ)	
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล (อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการ)	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การวิเคราะห์สารพฤกษเคมี การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน Phytochemical analysis, antioxidant and cytotoxic activity of *Diospyros decandra* lour. crude extract
ชื่อนักศึกษา	นายธีรพล สดไธสง นางสาวพรรษณมน สุระฉิมพลี นางสาวลำดวน คำเสียง
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ได้แก่ ใบ กิ่ง และก้าน จากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนใบและกิ่งของทั้งสองจังหวัด มีฤทธิ์สูงที่สุด เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์มีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 1.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดจากต้นจันอินมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบพฤกษเคมี โดยการหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบแทนนินทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์มีปริมาณมากที่สุดเทียบเท่ากับ 279.35 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และ 324.55 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดสระบุรีมีปริมาณมากที่สุดเทียบเท่ากับ 608.33 มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด และการวิเคราะห์หาสารประกอบแอนโทไซยานิน พบว่าสารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์มีปริมาณมากที่สุดเทียบเท่ากับ 55.11 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารสกัด และเมื่อนำสารสกัดมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 พบว่าค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดสระบุรี มีค่า CC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 4,584.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ, การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์, จันอิน, สารพฤกษเคมี

Title	Phytochemical analysis, antioxidant and cytotoxic activity of *Diospyros decandra* lour. crude extract
Students	Mr.Theeraphol Sodthaisong 58050768
	Miss.Phatsanamon Surachimplee 58050792
	Miss.Lamduan Khamsiang 58050807
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year	2018
Advisor	Asst.Prof. Suttijit Sriwatcharakul Ph.D.

Abstract

Study biological activities of (leaves, branch, and stalk) crude extracts of *Diospyros decandra* lour. collected from Buriram province and Saraburi province by using ethanol as a solvent. Analysis of antioxidant by DPPH scavenging assay method both two provinces found leaves and branch extract gave the highest antioxidant activity. Consider with IC_{50} value found that leaves extract from Buriram had the lowest value 1.38 mg/ml. Analyzed phytochemical content by total phenolic and total tannin compounds found that leaves extract from Buriram has the highest contents 279.35 mgGAE/g crude extract and 324.55 mgTAE/g crude extract, respectively and analysis of total flavonoid found that leaves extract from Saraburi had the highest compound 608.33 mgQE/g crude extract and analysis of anthocyanin found that stalk extract from Buriram gave highest content 55.11 mg cyanidin-3-glucoside/l crude extract. Cytotoxicity tested against MCF-7 cell found that stalk extract from Saraburi showed the lowest CC_{50} at 4584.54 µg/ml

Keyword : Antioxidant activity, Cytotoxicity, *Diospyros decandra* lour, Phytochemical

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัย พร้อมทั้งให้กำลังใจตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมารวมทั้งให้ความรู้แก่คณะผู้จัดทำ คณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่งจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยชี้นำแนวทางในการดำเนินงานวิจัยให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ลินจง สุขลำภู กรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยชี้นำแนวทางในการดำเนินงานวิจัยให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี รวมถึงอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาเคมีและภาควิชาสถิติทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ มอบความรู้เชิงทฤษฎีและเชิงปฏิบัติ ซึ่งคณะผู้จัดทำสามารถนำมาใช้ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนด้านปัจจัยต่างๆ ในการศึกษาของข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ที่ดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

ธีรพล สดไธสง
พรรษณมน สุระฉิมพลี
ลำดวน คำเสียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขต 1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 พฤกษศาสตร์ของต้นจันอิน 3
2.2 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) 5
2.2.1 การแบ่งประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ 7
2.2.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ 8
2.2.3 ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีต่อร่างกาย 9
2.3 ความหมายของอนุมูลอิสระ 9
2.3.1 Antioxidant Enzyme 13
2.3.2 Antioxidant Network 14
2.4 สารพฤกษเคมี (Phytochemical) 16
2.4.1 สารประกอบฟีนอลิก 16
2.4.2 สารประกอบแทนนิน 16
2.4.3 กรดแทนนิก 20
2.4.4 สารประกอบฟลาโวนอยด์ 21
2.4.5 แอนโทไซยานิน 22
2.5 มะเร็ง 23
2.5.1 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ 23
2.6 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 24
2.6.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT 25
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 27

3.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง 27
3.2 เซลล์มะเร็ง 27
3.3 สารเคมี 27
3.4 เครื่องมือ 28
3.5 วิธีการทดลอง 29
3.5.1 กระบวนการสกัดสารจากต้นจันอิน 29
3.5.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน 30
3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากต้นจันอินด้วยวิธี DPPH scavenging method 30
3.5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ 31
3.5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนิน 32
3.5.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน 32
3.5.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 33
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ 34

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 35

4.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน 35
4.2 การหาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน 35
4.2.1 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 35
4.2.2 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 36
4.2.3 การวิเคราะห์หาสารประกอบแทนนินทั้งหมด 37
4.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน 38
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity 40
4.4 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ด้วยวิธี MTT 43

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 48

5.1 สรุปผลการวิจัย 48
5.2 ข้อเสนอแนะ 48

เอกสารอ้างอิง 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก 52
ภาคผนวก ก 53
ภาคผนวก ข 57
ภาคผนวก ค 65
ภาคผนวก ง 70
ภาคผนวก จ 75
ภาคผนวก ฉ 79
ภาคผนวก ช 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการเป็น radical ของโมเลกุล 10
4.1 ปริมาณและเปอร์เซ็นผลได้ในสารสกัดหยาบของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรีในตัวทำละลายเอทานอล 95% 35
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วนต่าง ๆ จากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี 36
4.3 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี 37
4.4 แสดงปริมาณของสารแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน ส่วนใบ กิ่ง และก้าน 38
4.5 แสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี 39
4.6 แสดงร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH) ของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี 40
4.7 ค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้าน จากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี 42
4.8 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนต่างๆ จากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี 45
4.9 แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนต่างๆ จากจังหวัดบุรีรัมย์ และสระบุรี 46
ก.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร 54
ก.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วน ใบ กิ่ง และก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี 55
ข.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ 60
ข.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของวิตามินอีและค่าร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี (Positive control) 60
ข.3 ค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ ส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ 61
ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานควอซิตินที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร 67
ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ ใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค.3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalents (QE/g of extract) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 68
ค.4 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง (mg of quercetin equivalents (QE/100 g dry weight) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 69
ง.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร 72
ง.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นจัน ... 72
ง.3 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalents (TAE)/g of extract) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสมการกราฟมาตรฐาน 73
ง.4 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (mg of tannic acid equivalents (TAE)/100 g of dry weight) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสมการกราฟมาตรฐาน 74
จ.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารประกอบแอนโทไซยานินจากส่วนต่างๆ ของตันจันอิน 76
จ.2 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร 76
จ.3 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร 77
จ.4 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH_3COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร 77
จ.5 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH_3COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร 78
จ.6 ค่าเฉลี่ยการหาสารประกอบแอนโทไซยานิน (mg cyaniding-3-glucoside/l crude extract) 78
ฉ.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ 80
ฉ.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ 80
ฉ.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ 81
ฉ.4 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ 82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ฉ.5 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่ง ของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 82
ฉ.6 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนก้าน ของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะลำต้นของจันอิน 3
2.2 แสดงลักษณะใบของจันอิน 4
2.3 แสดงลักษณะดอกของจันอิน 4
2.4 แสดงลักษณะผลของจันอิน 5
2.5 แสดงการจัดลำดับชั้นของสารต้านอนุมูลอิสระตามลำดับความแรงของสาร 7
2.6 แสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ Free radical scavenging 8
2.7 แสดง molecular orbital ของ oxygen ในสเตรทต่าง ๆ 11
2.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ ROS ไปเป็นโมเลกุลน้ำและการเกิด RS ต่าง ๆ 11
2.9 แสดงแหล่งของ ROS เกิดขึ้นจากในและนอกร่างกาย และแสดงถึงสมดุลของระบบ antioxidant 12
2.10 แสดงการทำงานของ antioxidant enzyme 13
2.11 แสดงการเกิด Fenton reaction ของโลหะหนัก 14
2.12 แสดง antioxidant network ภายในร่างกาย 15
2.13 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของ glutathione ในร่างกาย 15
2.14 แสดงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก 16
2.15 แสดงโครงสร้างของแทนนิน 17
2.16 แสดงโครงสร้างของไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน (แกลโลแทนนิน) 18
2.17 แสดงโครงสร้างของคอนเดนส์แทนนิน 19
2.18 แสดงโครงสร้างของกรดแทนนิก 20
2.19 แสดงการจับกับโลหะหนักของ quercetin ที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อ DNA ได้ 21
2.20 แสดงการเกิด resonance ของอนุมูลอิสระในโมเลกุลของ cyanidin 22
2.21 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน 22
2.22 แสดงลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 cell line 23
4.1 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH Reduction) ระหว่างสารสกัดหยาบจากต้นจันอินที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1.25 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 42
4.2 กราฟแสดงเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (%Cytotoxic) ระหว่างสารสกัดหยาบต้นจันอินความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1 10 100 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากส่วนใบ กิ่ง และก้าน จากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี 45
ก.1 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของกรดแกลลิก 55
ข.1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้าน 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ข.2 แสดงการเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้าน 59
ข.3 กราฟแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์.... 62
ข.4 กราฟแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี.... 62
ข.5 กราฟแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์.... 63
ข.6 กราฟแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี.... 63
ข.7 กราฟแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์ 64
ข.8 กราฟแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี 64
ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารควอซิตินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 66
ง.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรกับปริมาณเนื้อสารของกรดแทนนิกในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 71
ฉ.1 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์ 83
ฉ.2 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี 84
ฉ.3 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์ 84
ฉ.4 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี 85
ฉ.5 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์ 85
ฉ.6 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DPPH	2,2-diphenyl-l-picrylhydrazyl
µg/ml	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
cell/ml	เซลล์ต่อมิลลิลิตร
IC_{50}	Inhibition Concentration 50 %
CC_{50}	Cytotoxicity Concentration 50 %
MTT assay	MTT (3-(4,5-dimethylthaiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumm bromide) tetrazolium reduction assay
mgGAE/g	เทียบเท่ามิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด
mgGAE/g dry weight	เทียบเท่ามิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
mgQE/g สารสกัด	เทียบเท่ามิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมสารสกัด
mgQE/g dry weight	เทียบเท่ามิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
mgTAE/g สารสกัด	เทียบเท่ามิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ต้นจันอิน อยู่ในวงศ์มะพลับ (Ebeneceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros decandra* Lour. มีชื่อเรียกอื่น ๆ ว่า จัน จันขาว จันลูกหอม จันโอ ต้นจันอินเป็นไม้ยืนต้น มีขนาดความสูงประมาณ 10-20 เมตร ลักษณะต้นตรง เปลือกต้นเรียบ มีสีน้ำตาลเข้มอมเทาหรือดำ แตกเป็นสะเก็ด เนื้อไม้มีสีขาว มีกิ่งก้านเหนียว ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ เป็นรูปวงรี แผ่นใบเรียบบาง มันลื่น ลักษณะหรือรูปร่างผลจะกลมหรือกลมแป้น เมื่อผลสุกจะมีสีเหลืองและมีกลิ่นหอม เนื้อผลจะมีรสหวาน นิยมนำมารับประทานเมื่อสุก ลักษณะดอกมีสีขาวนวลหรือสีเหลืองอ่อน เป็นดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ โดยส่วนประกอบของต้นจันอินที่ได้กล่าวไป จะมีสรรพคุณทางสมุนไพรที่ต่างกัน คือ แก่นจะช่วยบำรุงผิวพรรณ แก้อาการอ่อนเพลีย บำรุงหัวใจ แก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้อาการไข้ แก้ตับพิการ บำรุงตับและปอดให้ปกติ ผลจะช่วยบำรุงให้สดชื่น แก้อาการนอนไม่หลับ กระสับกระส่าย แก้อาการท้องเสีย เนื้อไม้จะช่วยบำรุงเลือดลม แก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้ดีพิการและขับพยาธิ เนื้อไม้แข็งจะนิยมนำมาเป็นฟืนเป็นถ่าน และเนื้อไม้อินจันเป็นเนื้อไม้ที่มีลวดลายสวยงาม ทำให้เป็นที่นิยมนำมาทำเฟอร์นิเจอร์ประดับตกแต่ง แต่ในปัจจุบันนี้จัดเป็นไม้หวงห้าม เนื่องจากหายากและใกล้สูญพันธุ์ นอกจากนี้มีงานวิจัยผลไม้ไทย ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในจันอิน และการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นจะมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (กรณ์กาญจน์, 2552) ซึ่งสารนี้เป็นสารประกอบทางธรรมชาติที่มีความหลากหลาย มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ และในทางเภสัชวิทยามีฤทธิ์ในการต้านภูมิแพ้ ป้องกันมะเร็งและต่อต้านริ้วรอย (Kubola *et al*, 2011) และงานวิจัยทางด้านการแพทย์จากมหาวิทยาลัยสงขลา เรื่องพืชสมุนไพรใช้สำหรับรักษาความดันโลหิตสูง โดยหมอพื้นบ้านในจังหวัดสงขลาในประเทศไทย โดยการนำแก่นของต้นจันอินสดมาผสมกับเลือดของแรดเล็กน้อย และดื่ม 1 ถ้วยชา ก่อนอาหาร 3 มื้อต่อวันจะช่วยในการขับลมและยังทำให้ระบบขับถ่ายดีขึ้น เป็นต้น (Neamsuwan *et al*, 2018) ซึ่งทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทางชีวภาพนอกเหนือจากการช่วยในการขับลม โดยจะนำมาศึกษาในเรื่องสารสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์การต่อต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF 7 cell line) จากต้นจันอิน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นจันอินจาก 2 แหล่ง คือ จังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรีในการต่อต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม
2. เพื่อศึกษาหาปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากต้นจันอิน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน จากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธีการทำ DPPH หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสารพฤกษเคมีบางชนิด รวมถึงทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell line) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากส่วนใบ กิ่ง และก้าน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลที่เป็นความรู้ในแนวลึก ข้อมูลที่เป็นความรู้ทางด้านฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เป็นความรู้ที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาการวิจัยผลิตภัณฑ์จากต้นจันอิน สามารถนำความรู้นี้ไปศึกษาต่อไปในทางการแพทย์หรือเภสัชวิทยาได้

2. เกิดการพัฒนาวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อพัฒนาการเรียนการสอนและงานวิจัย ความรู้ที่ได้ทั้งเทคนิคการทำวิจัย ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยสามารถที่จะใช้ในการพัฒนาหลักสูตรการเรียนการสอนสำหรับนักศึกษาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทำให้งานภาคนิพนธ์ของนักศึกษาระดับปริญญาตรี เป็นงานวิจัยที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงและสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พฤกษศาสตร์ของต้นจันอิน

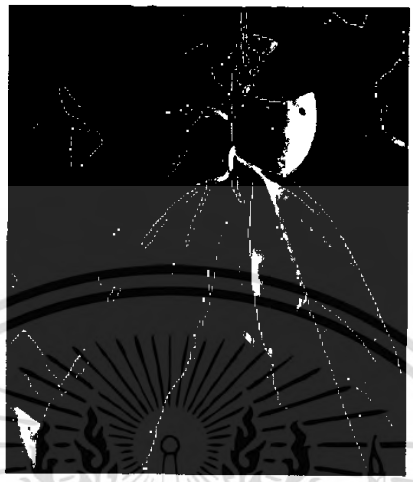
ชื่อวิทยาศาสตร์ : Scientific name : *Diospyros decandra* Lour.
ชื่อเรียกอื่น : Other name(s) : จัน จันขาว จันลูกหอม จันโอ อิน
ชื่อวงศ์ : Family name : EBENACEAE
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ไม่ผลัดใบ สูง 10-20 เมตร
ลักษณะลำต้น : ลำต้น เรือนยอดทรงกลมหรือกระสวย หนาทึบ ลำต้นตรง เนื้อไม้สีขาว เปลือกต้นสีน้ำตาลอมดำแตกเป็นสะเก็ด ลำต้นตรง เปลือกสีดำ
ลักษณะใบ : ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ รูปขอบขนาน กว้าง 1-3 เซนติเมตร ยาว 7-10 เซนติเมตร โคนใบมีลักษณะมน ปลายใบสอบหรือแหลม เนื้อใบบาง ใบเรียบเป็นมันลื่น สีเขียวเข้ม ท้องใบเรียบ สีอ่อนกว่า เมื่อยังอ่อนมีขนยาวสีแดงปกคลุม ก้านใบยาว 3-5 เซนติเมตร

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะลำต้นของจันอิน
ที่มา http://papangkorn123.multiply.com/. (สืบค้นวันที่ 22 ธันวาคม 2561)

ลักษณะดอก : ดอก เป็นดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ แยกเพศอยู่คนละต้น สีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อขนาดเล็ก ช่อหนึ่งมีประมาณ 3 ดอก ก้านดอกยาว 2-4 มิลลิเมตร ตามส่วนต่างๆ มีขนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลแดงปกคลุม กลีบเลี้ยง 4-5 กลีบ เรียงเป็นรูปถ้วยแต่ไม่เชื่อมติดกัน กลีบดอก 4-5 กลีบ โคนกลีบเชื่อมติดกันเป็นรูปเหยือกน้ำ ดอกเพศเมียออกเป็นดอกเดี่ยวตามกิ่งเล็กๆ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหมือนดอกเพศผู้ แต่ใหญ่กว่าใบ



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะใบของจันอิน
ที่มา http://papangkorn123.multiply.com/. (สืบค้นวันที่ 22 ธันวาคม 2561)

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะดอกของจันอิน
ที่มา http://papangkorn123.multiply.com/. (สืบค้นวันที่ 22 ธันวาคม 2561)

ลักษณะผล : ผลกลม และกลมแป้น ผิวเกลี้ยง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางผล 4-8 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียวแต่เมื่อสุกแล้วจะเป็นสีเหลือง ที่ผลยังมีส่วนของกลีบเลี้ยงติดอยู่ที่จุก เนื้อนุ่ม รสหวาน และมีกลิ่นหอม นิยมนำมารับประทานเมื่อสุก โดยผลจันอินจะมีอยู่สองแบบคือลักษณะของผลเป็นรูปกลมแป้น ไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบ ผลที่มีรอยบุ๋มตรงกลางจะมีรสฝาดหวาน มีกลิ่นหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะผลของจันอิน
ที่มา http://papangkorn123.multiply.com/. (สืบค้นวันที่ 22 ธันวาคม 2561)

2.2 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นสารที่ช่วยต่อต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระ (Free Radicals) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในร่างกาย ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถพบได้จากหลากหลายรูปแบบตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นกระบวนออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม น้ำมันพืชที่มีกลิ่นเหม็นหืน ผลแอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ

สารต้านอนุมูลอิสระคือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ได้ (Halliwell, 1995) สารเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับเหล็ก (Fe^{2+}) ป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น ปกติร่างกายคนเรานั้นจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxide เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น urate, bilirubin และ transferrin เป็นต้น เนื่องจากสารเหล่านี้มีจำนวนจำกัด ดังนั้นเมื่อใดก็ตามที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเกินกว่าจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ ดังที่กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้ยังมีพวกวิตามินบางชนิด เช่น บีตาแคโรทีน (β-carotene) วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) รวมทั้งสารประกอบกลุ่ม polyphenols ต่าง ๆ ซึ่งมีรายงานพบมากในพืช ผัก ผลไม้ ทั่วไปยังจัดเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติที่ดีอีกกลุ่มหนึ่ง (Sies, 1991)

โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ความเครียด การนอนดึกติดต่อกันนาน ๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่าง ๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และ อนุมูลอิสระเกิดเป็นภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกการจัดจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อทำให้เป็นต้นเหตุของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น เป็นต้นเหตุของภาวะหลอดเลือดอุดตัน มะเร็ง Parkinson รวมถึงอาการอักเสบต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก นอกจากการไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระควรจะต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ร่วมด้วย

1. ป้องกันการเกิดขึ้นของ ROS ได้

2. สามารถจับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทำอันตรายเนื้อเยื่อต่าง ๆ

3. ต้องไม่เพิ่มความแรงของอนุมูลอิสระหรือไม่เปลี่ยน ROS ที่มีความแรงต่ำไปเป็น ROS ที่มีความแรงสูง เช่น ไม่เปลี่ยนจาก super oxide ไปเป็น hydroxyl radical เป็นต้น

4. ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทางานของ antioxidant enzyme หรือสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ

5. เพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ

เราสามารถแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้เป็น 4 ประเภทดังนี้

1. Intracellular antioxidants (antioxidant enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระเช่น catalase glutathione peroxidase superoxide dismutase

2. Extracellular antioxidants ได้แก่ Vitamin C สารที่มีกลุ่ม sulfhydryl groups

3. Membrane antioxidants ได้แก่ Carotenoids Ubiquinone Vitamin E

4. สารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Copper Manganese Selenium Zinc

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการออกฤทธิ์ (Sherwin, 1990) คือ

1. สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ

เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน (H^+) หรืออิเล็คตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรงเป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น สารออกฤทธิ์ในลักษณะดังกล่าว ได้แก่ สารประกอบกลุ่ม phenolic เช่น flavonoids, eugenol และ vanillin เป็นต้น มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้จะทำหน้าที่ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้ (Rajalakshni and Narasimhan, 1996)

2. สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ

สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในลักษณะต่าง ๆ เช่น จับกับ Fe^+ ดักจับออกซิเดชัน ดูดซับรังสียูวีไว้เป็นต้น (Gordon, 2001)

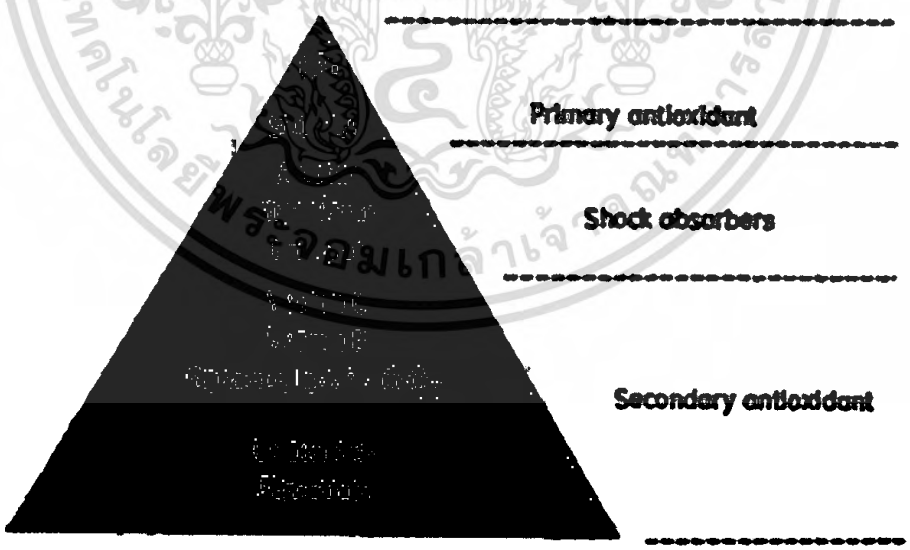
ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีขายในปัจจุบันนี้กว่าร้อยละ 90 จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนการนำไปใช้เพื่อหวังผลด้านสุขภาพนั้นขึ้นกับการศึกษาทั้งทางด้าน in vitro, in vivo และ clinical research โดยทั่วไปแล้วผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมักจะมีประโยชน์กับระบบต่าง ๆ เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือดช่วยในการมองเห็นเสริมสุขภาพความงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของผิวและผมเพื่อป้องกันโรคมะเร็ง และโรคจากความเสื่อมของระบบต่าง ๆ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่ เช่น vitamin E และ vitamin C สารในกลุ่ม flavonoids สารกลุ่ม carotenoids และสารกลุ่ม phenolics โดยลักษณะสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ที่มีร่วมกันก็คือ การมี conjugated double bond อยู่ในโครงสร้าง เพราะเมื่อสารเหล่านี้รับหรือสูญเสีย electron ไป free radical ที่เกิดขึ้นจะ delocalized ภายในโครงสร้างได้และทำให้โมเลกุลมีความเสถียรกว่าสารที่ไม่มี conjugated double bond ดังนั้นความรุนแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมาใหม่ก็จะลดลง

2.2.1 การแบ่งประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดจะมีความแรงที่แตกต่างกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในหลอดทดลอง แล้วพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความแรงสูงที่สุดคือสารในกลุ่ม endogenous antioxidant ซึ่งนอกจากจะ มี potency สูงแล้วยังสามารถนำไปใช้เพื่อการเปลี่ยนแปลงสารให้เป็นไปตามที่ร่างกายต้องการได้อีกด้วย เช่น catalases, glutathione และ peroxidases หรือเรียกอีกอย่างว่า primary antioxidant สารต้านอนุมูลอิสระอีก ประเภทหนึ่งที่ถือเป็น shock absorbers มีความแรงรองลงมาจาก endogenous antioxidants โดยสาร เหล่านี้จะพบได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น albumin transferrin เป็นต้น อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้ไม่สามารถสร้างขึ้นได้หากในร่างกายเกิดภาวะ oxidative stress ไปแล้ว กลุ่มต่อมาจัดเป็นสารในกลุ่ม vitamin กรดอะมิโน บางชนิด และ co-enzyme Q10 และกลุ่มสุดท้ายซึ่งมีมากที่สุดประกอบไปด้วยสารทุติยภูมิที่มีรายงานการต้านอนุมูลอิสระเช่น flavonoids, polyphenols และ carotenoids เป็นต้น โดย 2 กลุ่มสุดท้ายจะเรียกว่า secondary antioxidant ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงการจัดลำดับชั้นของสารต้านอนุมูลอิสระตามลำดับความแรงของสาร
ที่มา : อธิป, 2559.

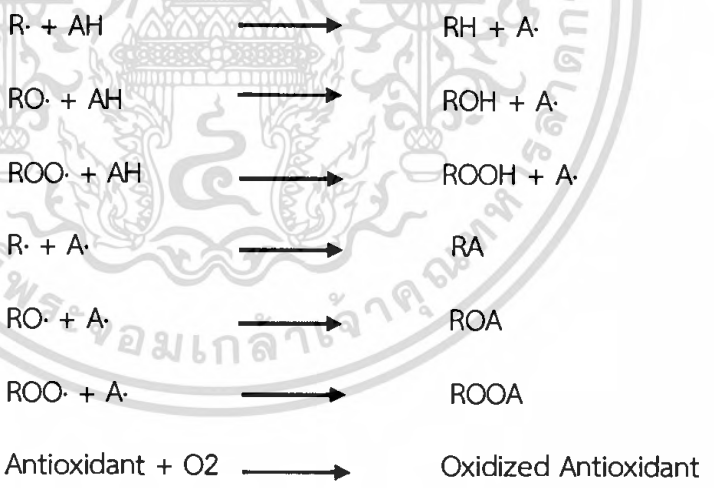
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

หน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระ ก็คือการเข้ากำจัดสารอนุมูลอิสระในร่ากาย และยังทำหน้าที่ชะลอความเสื่อมสภาพของเซลล์ต่าง ๆ ทำหน้าที่คงความอ่อนเยาว์ให้กับผิวและอวัยวะภายใน ดังนั้น บทบาทหลักของสารต้านอนุมูลอิสระ คือทำหน้าที่ "ลดการสร้าง" อนุมูลอิสระภายในร่างกาย และ "ลดอันตราย" ที่เกิดขึ้น

การเข้าไปทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ จะเข้าไปจับกับตัวรับที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ เข้าไปทำลายเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะตรงเข้าขัดขวางปฏิกิริยาดังกล่าว เข้าจับกับสารอนุมูลอิสระ ยับยั้งไม่ให้เกิดการทำลายเซลล์ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน และถูกออกซิไดซ์ โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวรีดิวซ์

1. Free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็คตรอนแก่อนุมูลอิสระ และทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ ไฮโดรเจนหรืออิเล็คตรอนไปแล้วก็จะเกิดเป็นอนุมูลตัวใหม่ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม อาจจะไปรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ มาให้อิเล็คตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไปดังแสดงในรูปที่ 2.6 สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA), Vitamin E (alpha-tocopherol) เป็นต้น



รูปที่ 2.6 กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ Free radical scavenging
ที่มา : อธิป, 2559.

2. Singlet oxygen quenching ($^1O_2$) ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน Singlet oxygen ($^1O_2$) ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen ($^3O_2$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น carotenoids โดย carotenoids 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ 1,000 โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Metal chelating โลหะหนักเช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภท เช่น peroxyl radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

2.2.3 ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีต่อร่างกาย

1. ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โดยทำหน้าที่ขับสารพิษที่เป็นต่อก่อให้เกิดมะเร็งออกจากร่างกาย

2. ชะลอความเสื่อมสภาพของเซลล์ต่าง ๆ จึงช่วยลดความเสื่อมสภาพของร่างกาย ช่วยคงความอ่อนเยาว์ และมีอายุที่ยืนยาวมากขึ้น

3. ยับยั้งการเจริญเติบโตและป้องกันการเกิดเนื้องอกในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

4. ช่วยป้องกันและลดการเกิดโรคภูมิแพ้ ช่วยให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น

5. ช่วยสร้างคอลลาเจนใต้ชั้นผิว ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อที่จะทำให้ผิวเต่งตึง ลดรอยตีนกาและความหย่อนคล้อย

6. ลดความเสี่ยงต่อโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุ

7. ช่วยปกป้องเซลล์ผิวหนังจากแสงแดด ความร้อน และรังสียูวีในอากาศ เปรียบเสมือนเกราะป้องกัน ไม่ให้ผิวเสื่อมสภาพ และยังเข้าไปทำหน้าที่ซ่อมแซมเซลล์ผิวไม่ให้หมองคล้ำอีกด้วย

8. ช่วยลดการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคทางสมอง โรคหลอดเลือด โรคหัวใจ โรคความดัน โรคกระดูกพรุน และโรคเรื้อรังที่พบในผู้ใหญ่วัยกลางคนไปจนถึงวัยสูงอายุ

2.3 ความหมายของอนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 electron เกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก อนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือโมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อย่างไรก็ตามการที่จะสรุปว่าอนุมูลอิสระทุกชนิดเป็นสารพิษต่อร่างกายนั้นไม่ถูกต้องนัก สิ่งที่ควรจะนำมาใช้บอกระดับความเป็นพิษควรจะเป็นความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายมากกว่าสารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ reactive chlorine species และ reactive nitrogen species ต้นโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation อาจจะพบได้ในรูปของ lipid radical

เอกสารนี้เป็นสมบัติของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

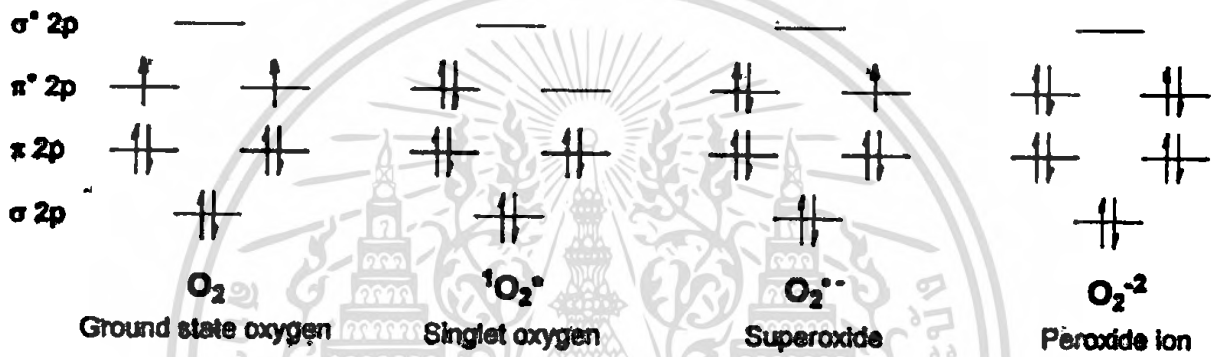
หรือ genetic radical RS นั้นไม่จำเป็นว่าจะต้องอยู่ในรูปของ free radical เสมอไป สารประกอบบางโมเลกุลที่อยู่ในรูป non-radical แต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation เช่น H_2O_2 ก็จัดเป็น RS เช่นกัน (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการเป็น radical ของโมเลกุล

Reactive oxygen species			
Free radicals	**Formula**	**Non-radicals**	**Formula**
Oxygen radical	$O_2^{\cdot}$	Single oxygen	$^1O_2^*$
Superoxide radical	$O_2^{\cdot-}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hydroxyl radical	$OH^{\cdot}$	Ozone	O_3
Hydroperoxyl radical	$HO_2^{\cdot}$	Organic peroxide	ROOH
Peroxyl radical	$RO_2^{\cdot}$		
Alkoxyl radical	$RO^{\cdot}$		
Carbonate radical	$CO_3^{\cdot-}$		
Reactive chlorine species			
Chlorine radical	$Cl^{\cdot}$	Hypochloric acid	HOCl
		Nitryl chloride	NO_2Cl
		Chlorine gas	Cl_2
Reactive nitrogen species			
Nitric oxide radical	$NO^{\cdot}$	Nitric oxide	HNO_2
Nitrogen dioxide radical	$NO_2^{\cdot}$	Peroxynitrite	$ONOO^-$
		Peroxynitrous acid	ONOOH
		Nitryl chloride	NOOCl

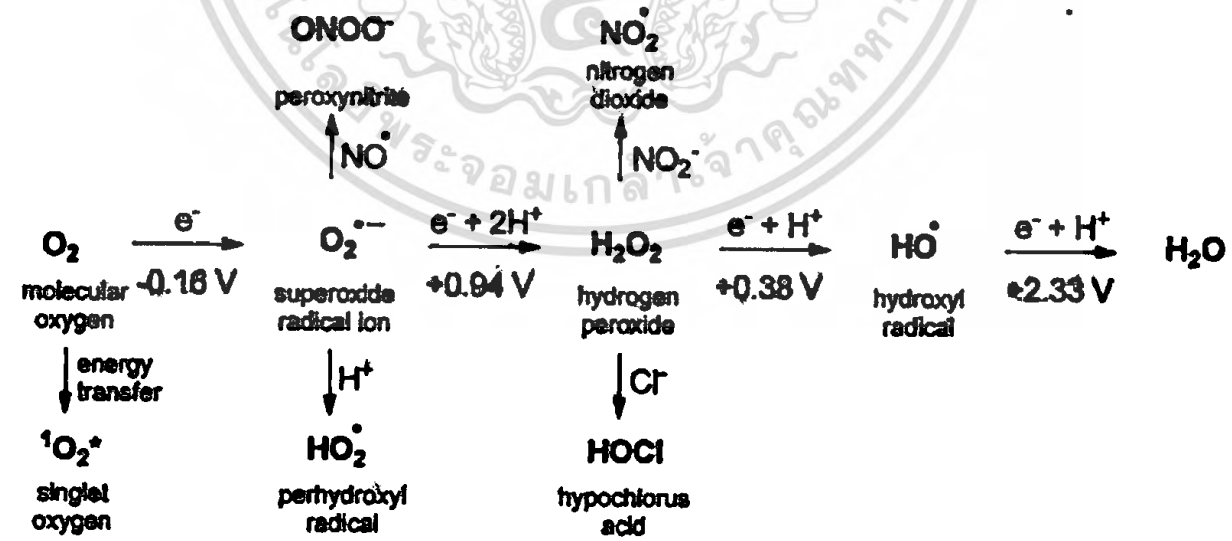
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน ground state oxygen ประกอบด้วย electron จำนวน 8 electron ที่โคจรอยู่ใน 5 orbital ได้แก่ 1S, 2S 2Pz 2Px และ 2Py ซึ่ง electron ที่อยู่ใน 2Px และ 2Py นั้นไม่ได้เข้าคู่ ทำให้โมเลกุลของ oxygen นั้นไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 2.7) เมื่อโมเลกุลของ oxygen รับ electron จากโมเลกุลอื่น เช่น โลหะหนัก (Fe, Cu)หรือ lipid free radical จะเกิดเป็น superoxide radical anion ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่แรงกว่า oxygen และพร้อมที่จะเปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide และ hydroxyl radical ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อโมเลกุล oxygen ถูกกระตุ้นด้วยแสง UV จะเกิดเป็น singlet oxygen ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่แรงกว่า superoxide radical anion อีกด้วย (รูปที่ 2.8) จะเห็นได้ว่า ROS เหล่านี้เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายและนำไปสู่การเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการเกิดปฏิกิริยาของ ROS คือน้ำ (H_2O) เนื่องจากน้ำไม่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งเป็นการป้องกันตัวเองของระบบการทำงานภายในเซลล์



รูปที่ 2.7 แสดง molecular orbital ของ oxygen ในสเตรทต่าง ๆ

ที่มา : อธิป, 2559.

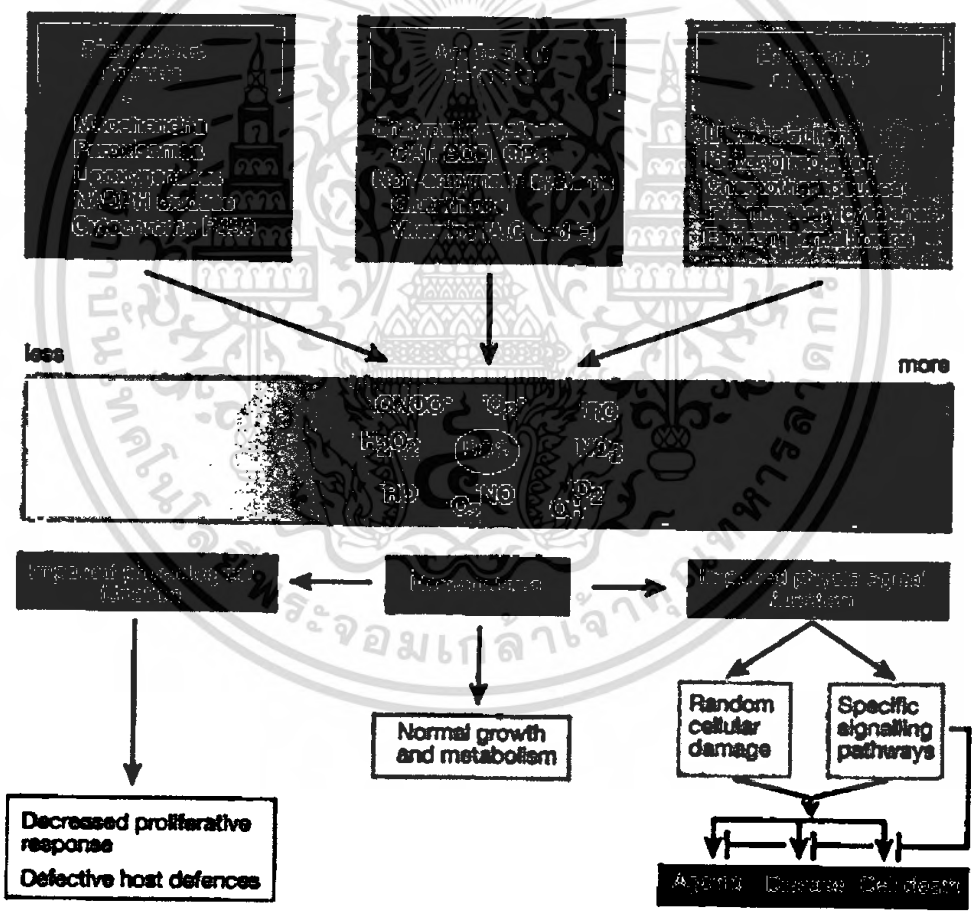


รูปที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงของ ROS ไปเป็นโมเลกุลน้ำและการเกิด RS ต่าง ๆ

ที่มา : อธิป, 2559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ROS นั้นเกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่าง ๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลชีพต่าง ๆ หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้นและทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นได้ ภาวะ oxidative stress นั้นหากเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ เพียงชั่วขณะนั้นจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนักแต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีผลไปทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ เยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึง DNA และจะนำไปสู่โรคในหลายระบบและนำไปสู่ความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ ได้ เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคทางสมองและระบบประสาท เช่น Parkinson และ Alzheimer ผลต่อระบบต่อมไร้ท่อต่าง ๆ มะเร็ง รวมไปถึงมีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนัง จากการศึกษาพบว่าภาวะ oxidative stress นั้นเป็นสาเหตุของโรค และร่างกายจะมีภาวะนี้เมื่อเป็นโรคบางอย่าง ซึ่งภาวะ oxidative stress ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรคเหล่านี้อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 แหล่งของ ROS เกิดขึ้นจากในและนอกร่างกาย และแสดงถึงสมดุลของระบบ antioxidant

ที่มา : อธิป, 2559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ROS เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แหล่งที่แตกต่างกันดังนี้

1. ปัจจัยภายในร่างกาย (Endogenous Sources)

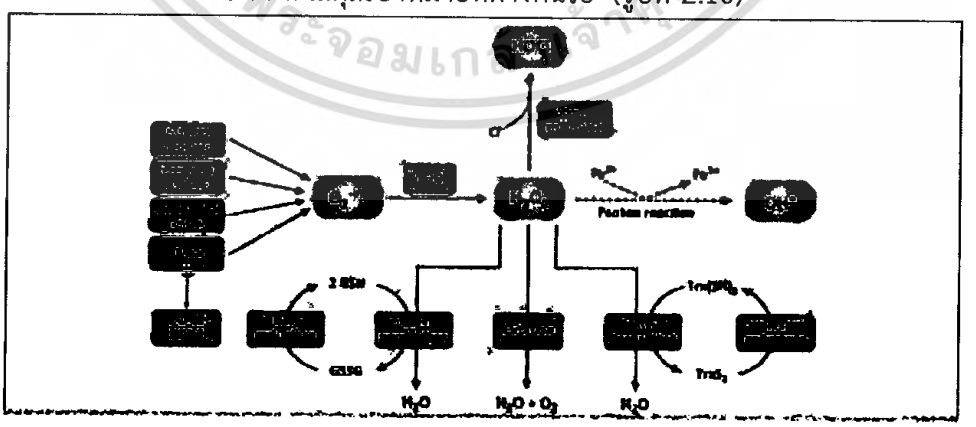
ROS จะเกิดขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกายผ่านกระบวนการสร้าง ATP โดย O_2 จะเปลี่ยนไปเป็น H_2O โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะต้องการ ATP วันละ 300 โมล ซึ่งจะได้จากการใช้ O2 จำนวน 100 โมล ซึ่ง ROS ที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยผ่านเอนไซม์และบางขั้นตอนก็ผ่านปฏิกิริยาโดยไม่ใช้เอนไซม์นอกจากการสร้างพลังงานแล้ว ในกลไกป้องกันตัวเองของร่างกายเมื่อถูก pathogen เข้ารุกรานก็มีการสร้าง ROS ขึ้นมาได้เช่นกัน โดยเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า oxidative burst เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเช่น macrophage และ leukocyte ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่าง ๆ จะมีการสร้าง $O_2^{\cdot-}$ ขึ้นผ่านทาง NADPH oxidase โมเลกุล $O_2^{\cdot-}$ ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น H_2O_2 และเกิดเป็น hypochlorite (HOCl) ในที่สุด

2. ปัจจัยภายนอกร่างกาย (Exogenous Sources)

ปัจจัยแวดล้อมนั้นมีส่วนอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิด ROS โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสีต่าง ๆ เช่น UV, X-ray, Gamma ray โดยรังสีเหล่านี้จะกระตุ้นให้น้ำเปลี่ยนไปเป็น hydroxyl radical อย่างง่ายดาย หรือแม้แต่มลภาวะทางเคมีเช่น paraquat ที่กระตุ้นให้เกิด peroxide หรือ ozone สารจากพวก quinones และ nitroaromatics ก็สารทำให้เกิด superoxide ได้ นอกจากนี้ยังมีโลหะหนักซึ่งเมื่อได้รับไปมาก ๆ ก็จะเสี่ยงต่อการเกิด Fenton reaction ได้ สารต่าง ๆ เหล่านี้มักจะก่อให้เกิดมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวกับการเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ อย่างไรก็ตามก็ยังมียาต้านมะเร็งที่ใช้ความสามารถของสารในการสร้าง ROS ขึ้นเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็งเช่น cisplatin และ adriamycin

2.3.1 Antioxidant Enzyme

เป็นที่ทราบกันว่า ROS ที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยผ่านเอนไซม์ภายในร่างกาย เอนไซม์ที่ใช้เพื่อการกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นเรียกรวมว่า antioxidant enzymes ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลักที่สำคัญได้แก่ superoxide dismutases (SODs), catalases และ glutathione peroxidases ซึ่งแต่ละเอนไซม์มีโมเลกุลเป้าหมายที่ต่างกันไป (รูปที่ 2.10)



รูปที่ 2.10 การทำงานของ antioxidant enzyme

ที่มา : อธิป, 2559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Superoxide dismutases (SODs) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ superoxide ให้เปลี่ยนเป็น H_2O_2 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะพบในเซลล์ทุกเซลล์และพบใน extracellular fluid SODs นั้นจะมี cofactor เป็นโลหะหนักซึ่งได้แก่ Cu, Zn และ Mn ในมนุษย์ Cu/Zn-SODs จะพบใน cytoplasm ส่วน Mn-SODs จะพบใน mitochondria จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ของ SODs ยังคงเป็น ROS ซึ่งในสภาวะปกติจะมีเอนไซม์ catalases และ peroxidases เข้ามาเปลี่ยนโมเลกุลของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและ O_2 ต่อไป อย่างไรก็ตามหากร่างกายเกิดภาวะขาดเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดข้างต้นจะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และเสี่ยงต่อการเกิด Fenton reaction ซึ่งจะเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็น hydroxyl radical ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่รุนแรงได้ (รูปที่ 2.11)

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^-$$

รูปที่ 2.11 แสดงการเกิด Fenton reaction ของโลหะหนัก

ที่มา : อธิป, 2559.

2. Catalases เป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและ O_2 โดยใช้ substrate เป็น H_2O_2 จำนวน 2 โมเลกุล เอนไซม์ชนิดนี้มี Mn หรือ Fe เป็น cofactor ซึ่งจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ใน eukaryotic cell ทั่วไป

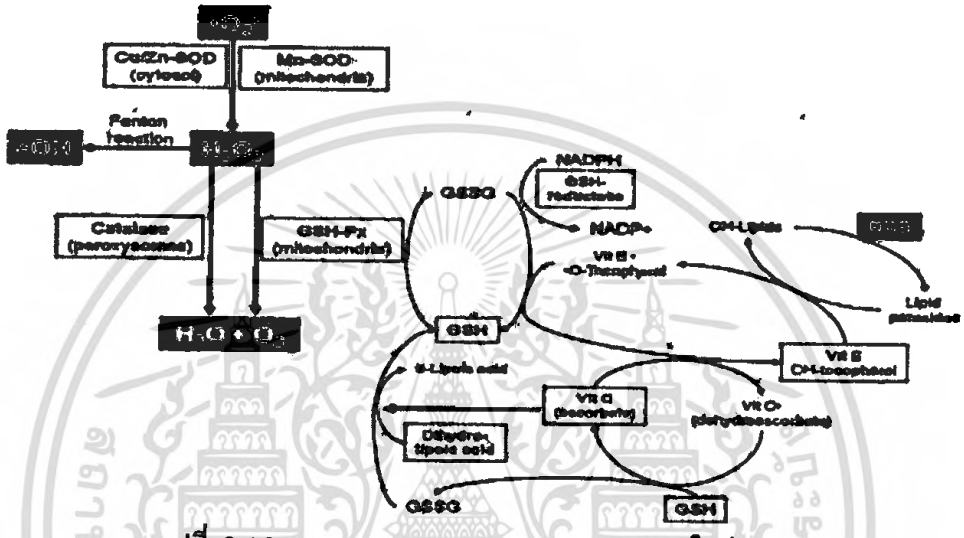
3. glutathione peroxidases ซึ่งจะช่วยเร่งปฏิกิริยา reduction ของ hydrogen peroxide ซึ่งจะเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ

2.3.2 Antioxidant network

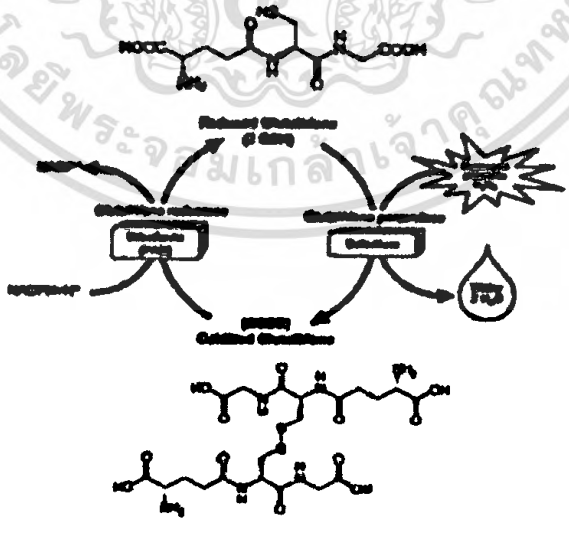
อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในแต่ละส่วนของเซลล์จะมีสารต้านอนุมูลอิสระที่เข้ามาจัดการที่แตกต่างกันตามสภาวะที่อยู่ เช่น หากอนุมูลอิสระนั้นเกิดที่ชั้น lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ vitamin E จะเข้ามามีบทบาทในการรับ free radical เหล่านั้น แต่ถ้าหากเกิดขึ้นใน cytoplasm vitamin C ซึ่งละลายในน้ำได้ดีก็จะเข้ามามีบทบาทแทน หากคิดตามทฤษฎีการเกิด ROS ในร่างกายแล้ว ในทุก ๆ วันจะต้องมี ROS เกิดขึ้นประมาณ 1 mol หากสมมติว่า vitamin E เป็น antioxidant เพียงอย่างเดียวที่ใช้ในการกำจัด ROS เราจำเป็นต้องได้รับ vitamin E ถึง 431 กรัมต่อวันซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่จะได้รับ vitamin E ที่สูงขนาดนั้นในการรับประทานอาหารตามปกติ แสดงให้เห็นว่าร่างกายมีกลไกจำนวนมากในการรับมือกับ ROS ที่เกิดขึ้น และส่งผ่าน free radical ต่อ ๆ กันไป โดยทำงานกันอย่างเป็นระบบ เรียกว่า antioxidant network เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้รับหรือให้ electron แก่อนุมูลอิสระไป ตัวสารนั้นก็จะกลายเป็น pro-oxidant โดยสามารถอธิบาย antioxidant network ภายในร่างกายได้ดังนี้ เมื่อเกิด lipid peroxidation ที่เยื่อหุ้มเซลล์ อนุมูลอิสระเกิดขึ้นที่บริเวณ lipid bilayer จะมี vitamin E (α-tocopherol) มารับไปเกิดเป็น vitamin E radical ซึ่ง vitamin C (ascorbic acid) จะมารับ free radical ต่อและเปลี่ยนให้กลับมาเป็น vitamin E ปกติจากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reduced glutathione (GSH) จะมารับ free radical จาก vitamin C radical (dehydroascorbic acid) และ coupling กับ GSH อีกโมเลกุล เกิดเป็น oxidized glutathione (GSSG) ก็จะเป็นการกำจัด free radical ออกไปได้เพื่อที่จะนำเอา glutathione กลับมาใช้อีกครั้ง ในร่างกายจะมี GSH reductase ที่ทำงานควบคู่กับ riboflavin เพื่อจะเปลี่ยน GSSG ให้กลับมาอยู่ในรูป GSH และพร้อมที่จะจับกับอนุมูลอิสระต่อไป นอกจากนี้ vitamin C และ dihydrolipoic acid ก็ยังช่วยในกระบวนการเปลี่ยน GSSG ให้กลับมาอยู่ในรูป GSH เช่นกัน (รูปที่ 2.12 และ 2.13)



รูปที่ 2.12 แสดง antioxidant network ภายในร่างกาย
ที่มา : อธิป, 2559.



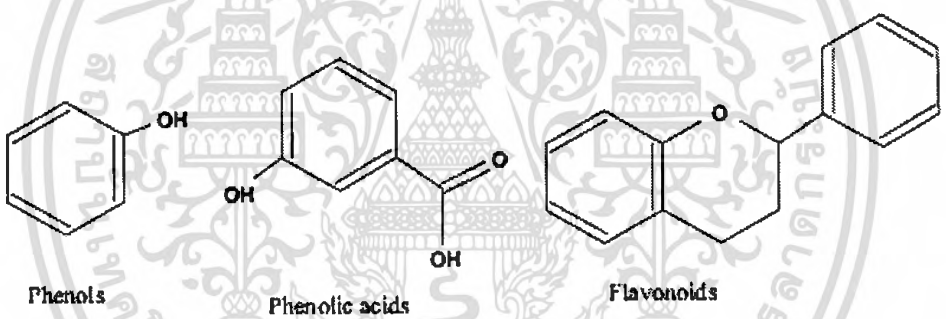
รูปที่ 2.13 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของ glutathione ในร่างกาย
ที่มา : อธิป, 2559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สารพฤกษเคมี (Phytochemical)

2.4.1 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป โครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล อย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่า สามารถละลายน้ำได้ สารประกอบฟีนอลิกในพืชมักจะรวมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ ยังมีสารประกอบต่าง ๆ เช่น ซิมเปิล โมโนไซลิกฟีนอล (simple monocyclic phenol) ฟีนิลโพรพานอยด์ และโพลีฟีนอลิก ซึ่งได้แก่ ลิกนิน และแทนนิน เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น (อัญชนา, 2544) และพบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.14 มีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น



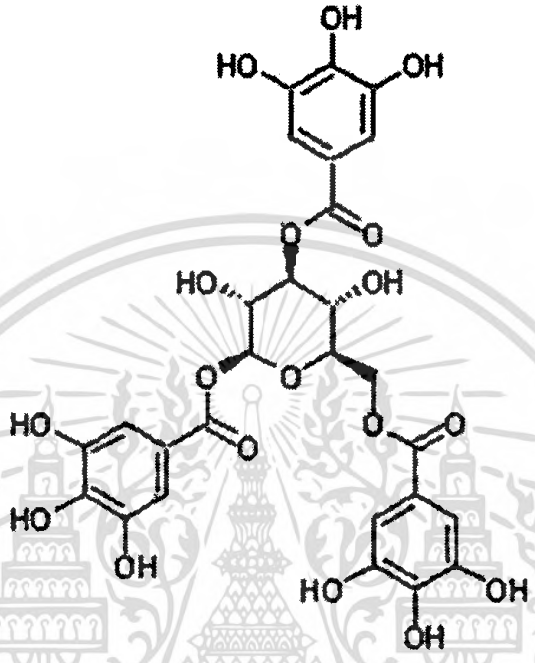
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก
ที่มา : โอภา, 2549.

2.4.2 สารประกอบแทนนิน (tannin)

แทนนิน มีรากศัพท์มาจากคำว่า “แทนนิ่ง (tanning)” แปลว่า การรักษาไว้ และกันน้ำ แทนนิ่ง คือกรรมวิธีในการเปลี่ยนหนังสัตว์ที่ตายแล้วให้เป็นผลิตภัณฑ์จากหนังสัตว์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยการใช้สารสกัดจากพืชแทนนิน เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่ และมีโครงสร้างซับซ้อน ดังแสดงในรูปที่ 2.15 มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนมีรสฝาด จึงเป็นสารที่ให้ความฝาดในพืช พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืชหลายชนิด แทนนินมีคุณสมบัติช่วยในการตกตะกอนโปรตีนทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย จึงมีการใช้สารแทนนินในอุตสาหกรรมการฟอกหนังในทางการแพทย์ พบว่า สารแทนนิน สามารถใช้เป็นยารักษาโรคท้องเสียได้ นอกจากนี้ ยังพบว่า สารแทนนิน บางประเภทมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้ เช่น ทีโอแกลลิน (theogallin) กรดแกลลิก (gallic acid) และกรดแอลลาจิก (ellagic acid) เป็นต้น (พีรศักดิ์, 2544) นอกจากนี้ สารละลายแทนนินยังมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการตกตะกอนโลหะหนักบางชนิด เช่น เหล็ก ตะกั่ว และสังกะสีได้ (Amelot, M. A. และคณะ, 2007) การเกิดปฏิกิริยา พบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์เชเบิลแทนนิน ทำปฏิกิริยากับเกลือของเฟอร์ริก เช่น เฟอร์ริกคลอไรด์ จะให้ตะกอนสีน้ำเงิน-ดำ ส่วนคอนเดนส์แทนนิน จะตกตะกอนสีน้ำตาล - เขียว (Naczyk และ Shahidi, 2004)



Tannin ($C_{27}H_{24}O_{18}$)

รูปที่ 2.15 โครงสร้างของแทนนิน

ที่มา : Connell, 2000.

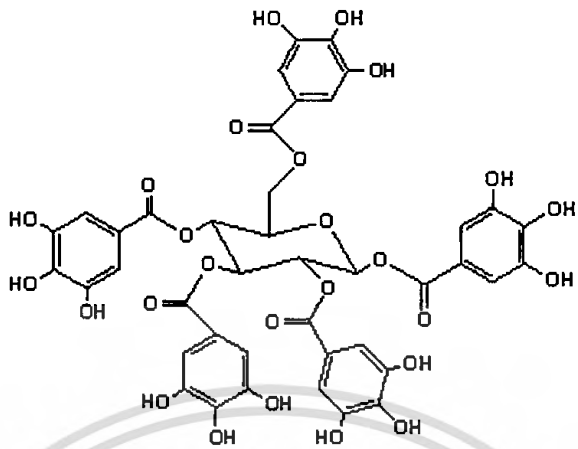
2.4.2.1 **ประเภทของแทนนิน**

แทนนินแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. ไฮโดรไลซ์เชเบิลแทนนิน (hydrolyzable tannins) ดังแสดงในรูปที่ 2.16 เป็นสารประกอบที่ประกอบไปด้วยส่วนโครงสร้าง 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ ส่วนแรกเป็นส่วนของน้ำตาล โดยส่วนมากพบว่า เป็นน้ำตาลกลูโคส หรืออาจเป็นสารประกอบโพลีออล (polyols) อื่น ๆ และส่วนที่สองเป็นกรดฟีนอลิก (phenolic acid) เช่น กรดแกลลิก หรือกรดเฮกซะไฮดรอกซีไดฟีนิก (hexahydroxydiphenic acid; HHDP) หรือสารอนุพันธ์ของกรดเฮกซะไฮดรอกซีไดฟีนิก มักอยู่ในรูปออกซิไดซ์ พบส่วนที่เป็นกรดฟีนอลิก มากกว่าส่วนของน้ำตาล หรือโพลิออลเชื่อมโยงกันด้วยพันธะเอสเตอร์ ที่เรียกว่า เดปไซด์ ลิงเกจ (depside linkage) ซึ่งพันธะเอสเตอร์นี้ สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ในสภาวะที่มีน้ำ และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยกรด เบส หรือเอนไซม์แทนเนสให้กรดฟีนอลิกและน้ำตาล หรือโพลิออล เมื่อนำไปกลั่นแบบแห้ง สารประกอบกรดฟีนอลิกจะเปลี่ยนเป็นไพโรแกลอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(pyrogallol) ดังนั้นไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนินจึงเรียก อีกอย่างว่า ไพโรแกลอล แทนนิน (pyrogallol tannins) มีหมู่ไฮดรอกซีอิสระ 3 หมู่ เมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์จะให้สีน้ำเงิน



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน (แกลโลแทนนิน)

ที่มา : Von Elbe และ Schwartz, 1996.

สารประกอบกลุ่มไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนินแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

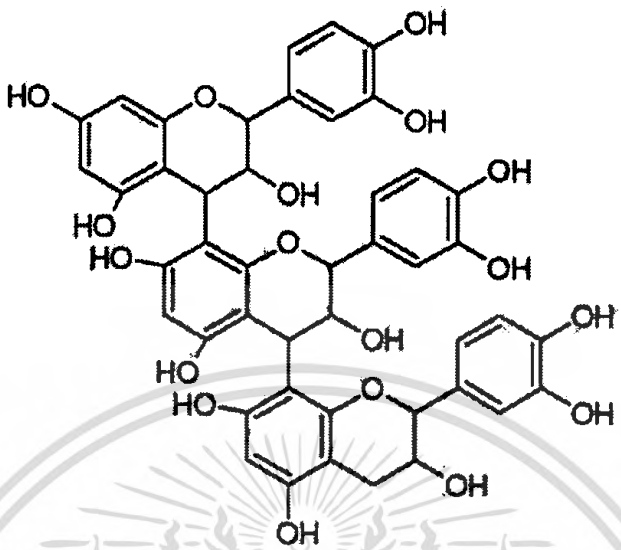
1) แกลโลแทนนิน (gallotannins) เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยกรดแกลลิกเชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคสด้วยพันธะเอสเตอร์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดเกิดการสลายตัวจะให้สาร 2 ชนิด คือ กรดแกลลิก และน้ำตาลกลูโคส ตัวอย่างของแกลโลแทนนิน ได้แก่ กรดแทนนิก (tannic acid หรือ chinese gallotannin) และทารา แกลโรแทนนิน (tara gallotannin) พืชที่เป็นแหล่งของแกลโลแทนนิน ได้แก่ โกศน้ำเต้า กานพลู และกลีบกุหลาบแดง เป็นต้น

2) แอลลาจิก แทนนิน (ellagic tannins) เป็นกลุ่มของสารประกอบโพลีฟีนอลที่ประกอบไปด้วยกรดเฮกซะไฮดรอกซีไดฟีนิก โดยอยู่รวมกับน้ำตาล แอลลาจิกแทนนินเมื่อเกิดการสลายตัวแบบปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรด ส่วนของกรดเฮกซะไฮดรอกซีไดฟีนิกจะแยกตัวออก และเกิดปฏิกิริยาแลกโทไนเซชัน (lactonization) ให้กรดแอลลาจิก ตัวอย่างของแอลลาจิกแทนนิน ได้แก่ เพดังคูลาจิน (pedunculagin) และกรดชิบูลาจิก (chebulagic acid) พืชที่นำไปใช้เป็นยาที่เป็นแหล่งของแอลลาจิกแทนนิน ได้แก่ เปลือกผลทับทิม ผลสมอไทย เปลือกต้นโอ๊ค และใบยูคาลิปตัส เป็นต้น

3) คอนเดนส์แทนนิน (condensed tannins) หรือที่เรียกอีกอย่างว่า โปรแอนโทรไซยานิดิน (proanthocyanidins) เป็นกลุ่มของสารประกอบพอลีฟีนอลที่มีความซับซ้อน และสลายตัวด้วยน้ำยากกว่ากลุ่มไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน โครงสร้างพอลีฟีนอลในกลุ่มนี้ เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.17 พืชที่เป็นแหล่งของคอนเดนส์แทนนิน ได้แก่ เปลือกอบเชย เปลือกชินโคนา เปลือกหลิว เปลือกโอ๊ค เปลือกโกโก้ เปลือก และใบชา เป็นต้น สารประกอบกลุ่มนี้เมื่อนำมาต้มกับกรด หรือทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะได้สารประกอบพอร์ลิเมอร์รูปอสัณฐานสีแดง ไม่สามารถละลายน้ำ เรียกว่า โฟบาฟีน (phobaphenes) หรือแทนนินแดง (tannin red) จึงเรียกสารกลุ่มนี้ ว่า โฟบาแทนนิน (phobatannins) เมื่อนำสารประกอบกลุ่มนี้ มาทำการกลั่นแบบแห้ง จะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบที่เป็น แคทีคอล แทนนิน (catechol tannins) สารในกลุ่มคอนเดนส์แทนนินประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซีอิสระ 2 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์จะให้สีเขียว



รูปที่ 2.17 โครงสร้างของคอนเดนส์แทนนิน

ที่มา : Deshpande และคณะ, 1986.

2.4.2.2 สมบัติของแทนนิน

1) มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาลอ่อน ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์

2) สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้ว เช่น น้ำ เอทานอล อะซิโตน และไพริดีน แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์

3) เมื่ออยู่ในน้ำมีสภาพเป็นคอลลอยด์ ไม่สามารถตกผลึก

4) มีสมบัติเป็นอัลคาลอยด์รีเอเจนต์ เช่น สามารถตกตะกอนเกลือของโลหะหนักได้

5) สามารถตกตะกอนโปรตีนได้

6) เมื่อถูกออกซิไดส์ทำให้มีสีเข้มขึ้น

2.4.2.3 การตรวจสมบัติของแทนนิน

แทนนินที่สกัดได้ประกอบด้วยสารหลายชนิดปะปนกันอยู่ ดังนั้นในการตรวจสมบัติของแทนนิน จึงใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ แทนนินจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน เมื่อเติมโฟลิน - เดนนีส รีเอเจนต์ วิเคราะห์ปริมาณแทนนินโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 745 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ การตรวจสมบัติการละลายแทนนินสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล อะซิโตน แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน อีเทอร์ เบนซีน และ คลอโรฟอร์ม การตรวจสมบัติทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคมี แทนนินเมื่อทำปฏิกิริยากับเกลือของเหล็ก เช่น เฟอร์ริกคลอไรด์ จะได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินแกมเขียวเพราะเป็นสารประกอบประเภทฟีนอลิก เมื่อทำปฏิกิริยากับเลดอะซิเตต ทำให้เลดอะซิเตตตกตะกอน เนื่องจากแทนนินมีคุณสมบัติในการจับไอออนของโลหะหนัก และตกตะกอนโปรตีน เช่น อัลบูมิน และเจลาติน ได้

2.4.2.4 ประโยชน์ของแทนนินในอุตสาหกรรม

1) ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

2) ใช้ในอุตสาหกรรมไม้อัด

3) ใช้ในอุตสาหกรรมสีย้อม น้ำหมึก และหมึกพิมพ์

4) ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ไวน์ สาเก น้ำผลไม้ ชา และกาแฟ

5) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

6) ใช้ในอุตสาหกรรมยา

7) ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

2.4.3 กรดแทนนิก (tannic acid)

กรดแทนนิก คือ แทนนินที่สกัดได้จากธรรมชาติแล้วผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสมบัติของกรดแทนนิกมีดังต่อไปนี้

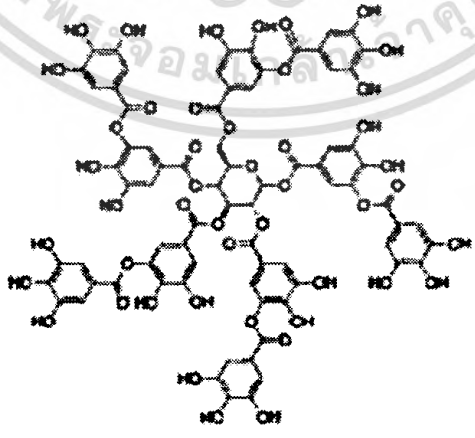
1) สูตรโมเลกุล $C_{76}H_{52}O_{46}$ ซึ่งโครงสร้างของกรดแทนนิก ดังแสดงในรูปที่ 2.18

2) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีสีน้ำตาลอ่อน มีสมบัติเป็นยาฝาดสมาน

3) เป็นของแข็งอสัณฐาน ละลายน้ำได้

4) มีจุดหลอมเหลว 210 องศาเซลเซียส

5) ติดไฟได้เองที่ 526 องศาเซลเซียส



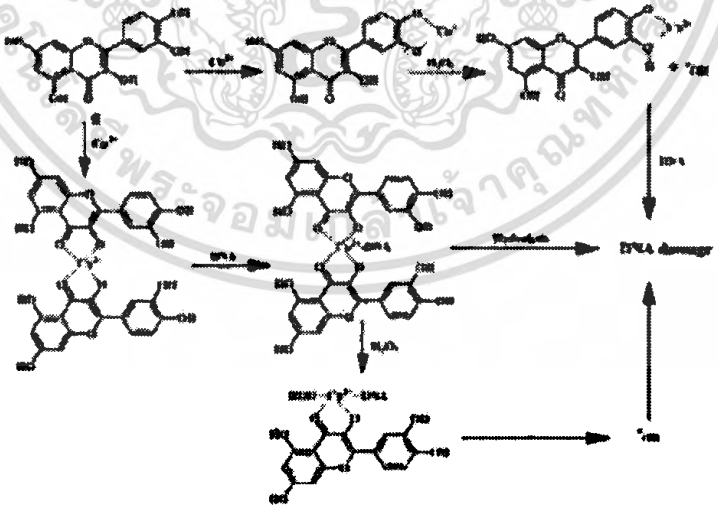
รูปที่ 2.18 โครงสร้างของกรดแทนนิก
ที่มา : Labieniec และ Gabryelak, 2003.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

เป็นสารที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก โดยเฉพาะการเป็น free radical scavenger สารในกลุ่มนี้มักพบในผัก และผลไม้ มีรายงานถึงความสามารถในการปกป้อง DNA จาก hydroxyl radical ได้ นอกจากจะเป็น free radical scavenger แล้วสารกลุ่ม flavonoid ยังมีกลไกที่สำคัญอีกอย่างก็คือการจับกับโลหะหนักโดยเฉพาะ Fe และ Cu ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิด fenton reaction ซึ่งจะก่อให้เกิด hydroxyl radical อีกด้วย อย่างไรก็ตามสารในกลุ่มนี้ยังเคยมีรายงานว่าเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งได้เช่นกัน เนื่องจาก complex ระหว่าง flavonoid กับโลหะหนัก quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoid ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมากในสภาวะที่ร่างกายมี Cu^{2+} ในความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 25 mM) แต่หากอยู่ในสภาวะที่มี Cu^{2+} มากกว่า 25 mM quercetin จะไปมีผลทำลาย DNA เสียเอง ทั้งนี้เกิดจากการเกิดเป็น complex ของสารกับโลหะหนักซึ่งจะไปจับกับ DNA และเมื่อเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ขึ้นก็จะทำให้ DNA ได้รับความเสียหาย (รูปที่ 2.19) ดังนั้นจึงควรระวังการใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเหล่านี้ร่วมกับผลิตภัณฑ์วิตามินที่มีการเสริมธาตุเหล็กและทองแดงเข้าไปในปริมาณสูง หรือผู้ป่วยที่มีภาวะความผิดปกติของธาตุเหล่านี้ด้วยเช่นผู้ป่วย Wilson's disease และผู้ที่มีภาวะ hemochromatosis หมู่ function ที่มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระของสารในกลุ่ม flavonoid มี 3 ตำแหน่งดังนี้

1. ตำแหน่ง ortho-dihydroxy ของ ring B
2. conjugated double bond ที่ติดต่อกันภายในโครงสร้าง
3. ตำแหน่ง 4-oxofunction (carbonyl group) ใน ring C

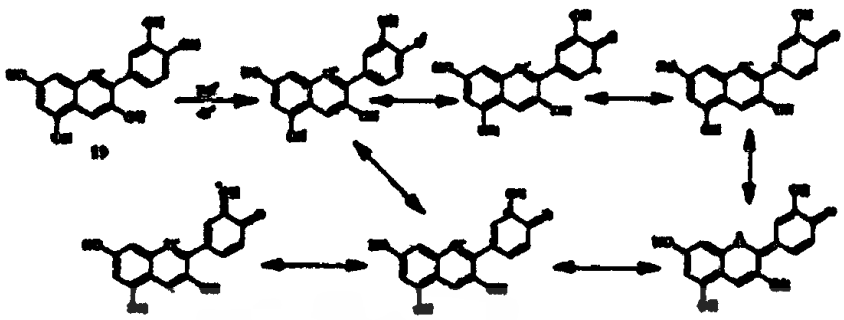


รูปที่ 2.19 การจับกับโลหะหนักของ quercetin ที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อ DNA ได้

ที่มา : อธิป, 2559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเมื่อสารในกลุ่มนี้รับอนุมูลอิสระเข้ามาในโมเลกุล อนุมูลอิสระจะเข้าไปอยู่ในวิถี resonance และ ทำให้โมเลกุลดังกล่าวเสถียรขึ้นและลดความรุนแรงของอนุมูลอิสระลง (รูปที่ 2.20)

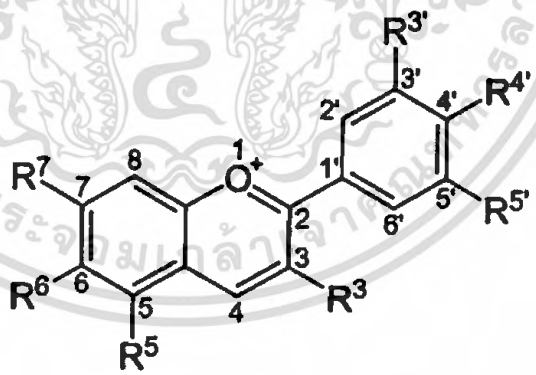


รูปที่ 2.20 การเกิด resonance ของอนุมูลอิสระในโมเลกุลของ cyaniding

ที่มา : อธิป, 2559.

2.4.5 แอนโทไซยานิน (anthocyanins)

จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) กลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenol) เป็นรงควัตถุที่พบในพืชทั้งในดอกและในผลของพืช ให้สีแดง น้ำเงิน หรือม่วง เป็นสารที่ละลายในน้ำได้ดี มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิโปโปรตีน และการตกตะกอนของเกล็ดเลือด ทำให้แอนโทไซยานินมีบทบาทในการป้องการการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ มะเร็ง เบาหวาน



รูปที่ 2.21 โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน

ที่มา : http://www.wikiwand.com/th/. (สืบค้นวันที่ 22 ธันวาคม 2561)

โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยสารประกอบ 2 หรือ 3 ชนิด ได้แก่

1. **แอนโทไซยานิดิน หรืออะไกลโคน(Aglycone) มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย คาร์บอนเชื่อมต่อกันในรูป C-6-C-3-C-6 เชื่อมต่อกัน ซึ่งแอนโทไซยานิดินที่พบมากในปัจจุบันจะมีอยู่ 6 ชนิด คือ เพลาโกนิดินไซยานิดิน เดลฟินิดิน พีโอนิดิน เพทูนิดิน และมอลวิดิน**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. น้ำตาล ซึ่งจะเกิดพันธะกับคาร์บอน ตำแหน่งที่ 3 หรือตำแหน่งที่ 3 และ 5 โดยน้ำตาลที่เกิดพันธะได้ เช่น กลูโคส กาแลกโตส รูติโนส แรมโนส เป็นต้น

3.โครงสร้างที่เป็นกรด ซึ่งส่วนนี้อาจมีหรือไม่มีก็ได้ แอนโทไซยานินที่มีกรดเป็นองค์ประกอบเรียกว่า นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน ถ้าไม่มีกรดเป็นองค์ประกอบเรียกว่า อะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน โดยกรดจะเกิดเอสเทอริฟิเคชัน กับน้ำตาล กรดที่เกิดพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาล เช่น กรดคูมาริก กรดเฟอร์รูริก กรดคาร์เฟอิก เป็นต้น

2.5 มะเร็ง (Cancer)

มะเร็ง คือ กลุ่มของโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติ ที่ DNA หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ ดังนั้น จึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติและในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น เนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง เพราะการเจริญเติบโตของหลอดเลือด ถ้าเซลล์พวกนี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น เช่น มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น (นรินทร์, 2548)

2.5.1 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (Human breast adenocaicinoma : MCF-7)

MCF-7 เป็นตัวย่อมาจาก Michigan Cancer Foudation-7 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 จากเนื้อเยื่อบริเวณทรวงอกของหญิงผิวขาวอายุ 69 ปี โดยที่หญิงผู้นี้ได้รับการผ่าตัดเอาเต้านมออกถึง 2 ครั้ง ครั้งแรกเป็นการผ่าตัดเนื้องอกที่ไม่อันตรายออก และในอีก 5 ปีถัดมาเธอได้รับการผ่าตัดอีกครั้งเพื่อจะผ่ามะเร็งเนื้อร้ายที่เกิดขึ้นในเยื่อหุ้มปอด ซึ่งจากครั้งนี้ได้เป็นการผ่าเอาเซลล์ MCF-7 ออกมา

รูปที่ 2.22 แสดงลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 cell line

ที่มา https://www.mybiosource.com/cell-line/mcf-7 . **(สืบค้นวันที่ 22 ธันวาคม 2561)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ไลน์ MCF-7 มีประโยชน์มากในการศึกษามะเร็งเต้านมในสภาวะการทดลอง เพราะว่าเซลล์ไลน์เหล่านี้ได้แสดงลักษณะเฉพาะที่เป็นต้นแบบที่ดีสำหรับเซลล์เยื่อบุของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหลาย รวมไปถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนเอสโตรเจน เพื่อสร้าง estradiol ผ่านตัวรับเอสโตรเจน ในบริเวณ ไซโตพลาสซึมของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีความว่องไวต่อไซโตเคราตินเป็นอย่างมาก เมื่อเซลล์ไลน์เหล่านี้เจริญบนภาชนะเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง เซลล์ไลน์เหล่านี้จะมีความสามารถในการสร้างเซลล์ในลักษณะเป็นทรงกลมและมีลักษณะคล้ายเยื่อบุในลักษณะการเจริญแบบ monolayer การเจริญของเซลล์ไลน์เหล่านี้สามารถยับยั้งได้โดยการใช้ tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) หรือการทรีตเซลล์ไลน์ด้วยสาร anti-estrogen (นงค์ลักษณ์, 2553)

2.6 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นวิธีการใช้เซลล์หลายๆ ชนิดไปทดสอบกับสาร แล้วนำมาวัดความมีชีวิตเพื่อประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมักจะนำไปประยุกต์ใช้ในงานคัดกรองหาสารที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งจากสารตัวอย่างหลายๆ ชนิด หรือประเมินความปลอดภัยของสารที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ในยาเครื่องสำอาง สารปรุงแต่งอาหาร ยาฆ่าแมลง สารเคมีทางอุตสาหกรรม และสารเคมีที่ปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมได้ โดยเริ่มใช้เซลล์สัตว์เป็นแบบจำลองที่เริ่มเป็นที่นิยมใช้มากขึ้นแทนการใช้สัตว์ทดลอง ทำให้การประเมินความเป็นพิษของสารทำได้รวดเร็วและสูญเสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนายาหรือผลิตภัณฑ์ลดลง การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีการใช้กันมากในการทดสอบการรักษาโรคมะเร็งทางเคมี หรือมะเร็งเคมีบำบัดและใช้ในงานวิเคราะห์ความปลอดภัยของสารเคมีต่างๆ ต่อเซลล์หรือสารในสภาพแวดล้อม รวมทั้งใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารเคมีในด้านการเกิดกลายพันธุ์ (mutagenicity) การเกิดมะเร็ง (cancinogenicity) การเกิดความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) และการเกิดความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity)

2.6.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytoxicity) เป็นสาเหตุที่ซ้ำซ้อน และมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง ดังนั้นในการวิเคราะห์ความเป็นพิษด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง จึงต้องทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น คุณสมบัติของสารขณะสัมผัสกับเซลล์ทดสอบ กลไกการเปลี่ยนแปลงของสารใหม่ในร่างกายหรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษ ชนิด และปริมาณของเซลล์ที่เป็นเซลล์เป้าหมาย ความเข้มข้นของสารและระยะเวลาสัมผัสจริงในธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ใกล้เคียงกับสภาวะความเป็นสิ่งมีชีวิต และได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อการใช้ได้

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต้องเลือกเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบให้เหมาะสม และควรเป็นเซลล์เป้าหมายอย่างแท้จริง เนื่องจากเซลล์ต่างชนิดกันอาจตอบสนองแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ได้ไม่เหมือนกัน ดังนั้นในการวิเคราะห์หายาต้านมะเร็งจะเป็นการหายาที่ทำลายเซลล์มะเร็งให้ตายโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ อย่างไรก็ตามลักษณะความเป็นพิษที่แตกต่างกัน อาจมีกลไกการออกฤทธิ์และให้ผลของฤทธิ์ยาแตกต่างกัน จึงต้องมีวิธีอื่นที่แตกต่างกันในการศึกษาโดยจุดยุติของแต่ละวิธีเป็นค่าที่บอกระดับความเสียหายที่เกิดกับเซลล์หลังการบ่มกับสารทดสอบและวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

วัดที่จุดยุติในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มีหลายวิธี เช่น การวัดสีเคมีด้วย crystal violet หรือ sulphorhodamine ที่จำเพาะกับองค์ประกอบของเซลล์ด้วยการวัดองค์ประกอบที่เหลือของเซลล์ด้วยการวัดองค์ประกอบที่เหลือของเซลล์หลังการบ่มกับสารทดสอบการวัดองค์ประกอบของเซลล์ ที่หลังออกมาหลังจากบ่มกับสารทดสอบการวัดกิจกรรมเมทาบอลิซึมของเซลล์ ด้วยการวัดการลดลงของสีจากการใช้เกลือ tetrazolium เช่น MTT assay เป็นต้น วัดการหลั่งให้สารรังสีที่ใส่ให้เซลล์ก่อนบ่มกับสารทดสอบ ซึ่งมีการหลั่งเนื้อเนื่องจากการแตกของเซลล์ การวัดดีเอ็นเอที่เสียหายหลังการบ่มกับสารทดสอบที่มีผลต่อพันธุกรรมด้วยวิธี micronucleus assay

2.7 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค Methyl tetrazolium (MTT)

การวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell Proliferation) ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารทดสอบ ซึ่งส่วนใหญ่จะดูความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ ปัจจุบันมีหลากหลายวิธีที่นิยมใช้วัด การเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น การนับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต วัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น รวมถึงการดูจากกิจกรรมเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ (metabolic activity) ซึ่งสามารถบ่งบอกว่าเซลล์ยังมีการใช้พลังงานในการเพิ่มจำนวนอยู่ ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนด้วยการวัด metabolism มีอยู่หลายวิธีเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น MTT, MTS และ XTT (colorimetric assay)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kubola *et al*. (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณวิตามินซีและน้ำตาลในผลไม้ไทย 19 ชนิด พบว่าสารสกัดลูกจันผลดิบมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 215 mg GAE/g และ 187 mg RE/g ตามลำดับ ผลการทดสอบด้วย DPPH คือ 95 % Inhibition พบ Gallic acid, Caffeic acid และ Ferulic acid เท่ากับ 90.90, 100.60 และ 112.76 mg/g ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ามีงานวิจัยในประเทศเกาหลี ทดสอบสารสกัดจากลำต้นและผลของพลับ ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับต้นจันอิน Rashed (2013) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นพลับ (*Diospyros Ebenum*) ด้วยสารที่ต่างกัน 4 ชนิด คือ 70 % เมทานอล Ethyl acetate, Butanol และน้ำ เมื่อทดสอบด้วย DPPH ผลที่ดีที่สุด คือ สารสกัดจาก 70 % เมทานอล ให้ผลการทดสอบ DPPH free radical scavenging effect (%) เท่ากับ 90 % และสารสกัดจาก 70 % เมทานอล พบสารฟลาโวนอยด์ แทนนิน ไตรเทอร์ปีน และคาร์โบไฮเดรต สารที่สกัดด้วย Butanol และ Ethyl acetate พบสารไตรเทอร์ปีน และฟลาโวนอยด์ ขณะที่สารที่สกัดด้วยน้ำ พบสารคาร์โบไฮเดรต และ แทนนิน

Lee *et al*. (2012) จากการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลพลับ (*Diospyros kaki L.* cv. Gapjubaekmok) 6 พื้นที่ในประเทศเกาหลี พบปริมาณ เฉลี่ยของ Tartaric acid, Glucose, Gallic acid, Epicatechin gallate และ Aspartic acid เท่ากับ 1876.51 mg/kg, 62.69 g/kg, 12.73 mg/kg, 208.99 mg/kg และ 31.84 mg/100 g ตามลำดับ พื้นที่ฮาดง พบว่าสารสกัดมีปริมาณน้ำตาล กรดฟีนอลิก และ Catechin มากที่สุด เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

130.60 g/kg, 42.27 mg/kg และ 527.97 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากพื้นที่นี้ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกรวม (298.01 mg GAE/kg) และฟลาโวนอยด์ (32.11 mg/kg RE) และ Jang *et al.* (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากผลพลับ (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) ที่แตกต่างกัน 4 ส่วน คือ กลีบเลี้ยง เมล็ด เปลือก และเนื้อ เมล็ดและกลีบ เลี้ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าเปลือกและเนื้อ สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสกัดด้วยเอทานอล จากการเหนี่ยวนำลิวโคไซต์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ไซด์ที่ความเข้มข้น 200 μM พบว่าสารสกัดทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำลายของดีเอ็นเอ โดยสารสกัดจากกลีบเลี้ยงและเมล็ดมีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่าเปลือกและเนื้อ

อรรัมภา สืบสาววงษ์ (2559) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากลูกจันในเครื่องสำอาง การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากลูกจันในเครื่องสำอางโดยการสกัดและทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากลูกจันที่สกัดด้วยเอทานอล จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มเหนียวและมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ (ร้อยละผลผลิต เท่ากับ 23.95 ต่อน้ำหนักของผลลูกจันสด) มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH คิดเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 0.22 mg/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยกว่าวิตามินซีมาตรฐาน (IC_{50} เท่ากับ 0.09 mg/ml) 2.44 เท่า และมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดเท่ากับ 173.09 ± 1.65 mg GAE/g extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน (*Diospyros decandra* lour.) จากอำเภอพุทไธสง จังหวัดบุรีรัมย์ และอำเภอเสาไห้ จังหวัดสระบุรี เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม ปี พ.ศ. 2561

3.2 เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell line)

3.3 สารเคมี

เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 95 และ 99.99

ไดเมทิลฟอกไซด์ (Dimethydulfoxied ; DMSO)

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

Folin ciocalteu's reagent

โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 และ 3.5 (Sodium carbonate ; $NaCl_3$)

กรดแกลลิก (Gallic acid)

2,2-Diphynyl-1-picrylhydraxyl (DPPH)

วิตามินอี 0.1 mM (α-tocopherol)

เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30

โซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite ; $NaNO_2$)

อะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ($AlCl_3$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M (NaOH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควอซิติน

โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.025 M, pH 1.0 (KCl)

โซเดียมอะซิเตท 0.04 M, pH 4.5 ($CH_3COOHNa$)

Folin-Denis's reagent

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer saline; PBS)

กรดแทนนิก (Tannic acid)

McFarland standard No.0.5

Trypsin

ซีรัม (Fetal bovine serum ; FBS)

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (RPMI 1640)

น้ำกลั่น

3.4 เครื่องมือ

เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven)

เครื่องปั่น (Blender) ยี่ห้อ Philips รุ่น EN-ICE 2

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAVS รุ่น Pioneer series

ชุดกรองสุญญากาศ ยี่ห้อ Merck Millipore

เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Heidolph™

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)

เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น G560E

เครื่องไมโครเพลท (Microplate reader) รุ่น Fluostar omega

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)

กระดาษกรอง Whatman No.1 รุ่น 1001 150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) ยี่ห้อ Mettler Toledo

96 well plate ยี่ห้อ Costar 96 well plate

ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 1,000 µl, 200 µl และ 10 µl ยี่ห้อ SCIPLUS

Mutichannel micropipette ขนาด 300 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf

ทิป (tip) สีเหลือง ขาว และฟ้า

ปิเปตแก้ว

บีกเกอร์ (Beaker)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

แผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminium foil)

ช้อนตักสาร

ที่ตั้งหลอดทดลอง (Rack for tube)

ปากคีบ (Forcep)

หลอดทดลอง (Test tube)

หลอด Eppendorf

กระบอกตวง

ขวดดูแรน (Duran)

ลูกยาง

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 กระบวนการสกัดสารจากต้นจันอิน

นำใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน ไปทำให้แห้งโดยอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน จากนั้นนำแต่ละส่วนของต้นจันอินที่อบแห้งมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผงที่บดละเอียดแต่ละส่วนของต้นจันอินไปชั่งน้ำหนักบนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างละ 100 กรัมและห่อด้วยผ้าขาวบางมัดปากให้สนิท จากนั้นแยกแต่ละส่วนใส่โหลคนละใบ แช่ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:9) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและมืดเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำส่วนที่เหลือมาแช่ใหม่อีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดส่วนใสที่ผ่านการกรองมาเพิ่มความเข้มข้นขึ้นโดยนำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 125 มิลลิบาร์ หมุนด้วยความเร็วรอบ 140 rpm จะได้สารสกัดหยาบจากต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้าน แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ขวดสีชาขนาดเล็ก ปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดสอบ

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน

เตรียมสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน ให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย ใส่สารสกัดหยาบจากแต่ละส่วนของต้นจันอิน ลงใน 96 well plate หลุมละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลาย Folin-Ciocateu's reagent หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ลงในหลุม ๆ ละ 80 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบของต้นจันอิน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และรายงานลงในรูปเทียบเท่ามิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg GAE/g extract)

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นจันอิน ด้วยวิธี DPPH scavenging method

การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน โดยใช้ 2,2-Diphynyl-1-picrylhydraxyl (DPPH) โดยนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 แล้วปรับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแต่ละส่วนของต้นจันอิน โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1.25 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate และเติม 2,2-Diphynyl-1-picrylhydraxyl (DPPH) ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของแต่ละส่วนสารสกัดหยาบ โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำอย่างละ 5 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินอี (α-tocopherol) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้เอทานอลความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 99.9 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากสมการดังนี้

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ (Blank)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

สำหรับการประเมินค่า IC_{50} ของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำได้โดยเขียนกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบเทียบกับ % DPPH reduction

3.5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน วิเคราะห์ตามวิธีของ (Kathirvel และ Sujatha, 2012) โดยปิเปตสารสกัดจากต้นจันอินแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของควอซิตินจากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด (mg quercetin equivalents (QE)/g of extract)

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของควอซิติน ที่ระดับความเข้มข้น 1 ถึง 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย วิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายมาตรฐานควอซิตินที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนสารสกัดจากต้นจันอิน ส่วนแบลงค์ (blank) ใช้เมทานอลความเข้มร้อยละ 30 แทนสารสกัด เมื่อได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานควอซิตินที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำค่าดูดกลืนที่ได้มาพลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณควอซิตินกับค่าการดูดกลืนแสงของควอซิตินจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีในตัวอย่างที่วิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนิน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนินในสารสกัดหยาบจากต้นจันอินจะวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Denis (Kathirvel และ Sujatha, 2012) ทำได้โดยปิเปตสารสกัดจากต้นจันอินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 7.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโฟลิน-เดนิช ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 35 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นั้นมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบแทนนินต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannin acid equivalent (TAE)/g of extract)

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแทนนิก ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบแทนนินด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีข้างต้น แต่ใช้สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนสารสกัดจากต้นจันอิน ส่วนแบลงค์ (blank) เป็นเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 แทนสารสกัด เมื่อได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแทนนิกกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดแทนนิกจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง

3.5.6 การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน

ใช้วิธี pH differential ดัดแปลงจากวิธีของ Wrolstad ในปี 1976 โดยนำสารละลายของสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน 40 ไมโครกรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร โดยหลอดที่ 1 ผสมสารสกัดตัวอย่างกับบัฟเฟอร์ KCl pH 1.0 ปริมาตร 270 ไมโครลิตร และหลอดที่ 2 ผสมสารสกัดตัวอย่างกับบัฟเฟอร์ $CH_3COOHNa$ pH 4.5 ปริมาตร 270 ไมโครลิตรผสมด้วยเครื่องเขย่าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตรตามลำดับ แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมของแอนโทไซยานินต่อลิตรของสารละลาย คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดจากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\varepsilon \times 1)$$

โดยที่ $A = (A520 - A700)_{pH\ 1.0} - (A520 - A700)_{pH\ 4.5}$

MW = มวลโมเลกุลของ cyanidin-3-glucoside (cyd-3-glu)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DF = Dilution factor

ε = Molar absorptivity

3.5.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.5.7.1 เตรียมเซลล์

เตรียมเซลล์ไลน์ MCF-7 ในอาหาร RPMI 1640 เสริมด้วย 10% FBS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร คำนวณปริมาณเซลล์มีชีวิตเพื่อใช้ทดสอบให้มีความหนาแน่น เท่ากับ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.5.7.2 เตรียม Stock สารสกัดที่ใช้ทดสอบ

โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นตั้งต้นประมาณ 1,000,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อ หุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ (aluminum foil) เพื่อป้องกันแสง จากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1. เตรียมละลาย MTT 50 มิลลิกรัม ใน PBS 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของ MTT เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายที่ได้มีสีเหลือง ทำการกรองด้วยชุดกรองสารขนาดช่องผ่าน 0.2 ไมโครเมตร เก็บสารละลายในขวดที่ปราศจากเชื้อ ห่อหุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF7 เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอล โดยเจือจางเป็นสิบเท่า (ten-fold dilution) ได้แก่ ความเข้มข้น 1 10 100 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ข้อควรระวัง คือ ความเข้มข้นของสารสกัด ควรจะมี DMSO ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพราะ DMSO มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นกลุ่มควบคุมมี 2 กลุ่ม คือเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารผสม DMSO 1% เพื่อเป็นการยืนยันความเป็นพิษของสารสกัดไม่ได้เกิดจากพิษของ DMSO

3.5.7.3 การทดสอบ

วางแผนการทดสอบโดยเตรียมแผนผังตามรูปแบบของภาชนะเพาะเลี้ยง ในที่นี้ใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปลูกเซลล์ MCF7 ลงในจานเพาะเลี้ยง โดยให้มีจำนวนเซลล์มีชีวิตเท่ากับ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดสอบ 5 ซ้ำ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำจากเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์เรียบร้อยแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 1 คืน หรือ 24 ชั่วโมง นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้บ่ม ดูดอาหารออกจากทุกหลุม แล้วเติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มนาน 48 ชั่วโมง ใช้ DMSO สำหรับละลายผลึกฟอร์มาซาน

เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดครบ 48 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุมที่ทดสอบ ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย DMSO 150 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน จะได้สารละลายสีม่วง

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งโปรแกรมการเขย่านาน 5 นาที เพื่อให้ผลึกฟอร์มาซานละลายทั้งหมด และความเข้มของสีกระจายทั่วทั้งหลุม บันทึกค่าการดูดกลืนแสงลงในตาราง และคำนวณหาค่า % cytotoxicity ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

$$\% \text{ Cytotoxicity} = (A-B/A) \times 100$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดแต่ละความเข้มข้น

โดยค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank (อาหาร) มาหักออกก่อน จากนั้นจึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น

จากนำผลการคำนวณค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (% Cytotoxicity) บันทึกลงในตาราง เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC_{50})

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) Version 23.0 ในการวิเคราะห์ทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน

สารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลองได้จากการแยกต้นจันอินเป็นส่วน ใบ กิ่ง และก้าน นำมาอบแห้ง บดละเอียด แล้วจึงนำมาแช่เอทานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 7 วัน นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วมาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณและเปอร์เซ็นผลได้ในสารสกัดหยาบของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรีในตัวทำละลายเอทานอล 95%

สารสกัดหยาบจากต้นจันอิน	จังหวัดบุรีรัมย์			จังหวัดสระบุรี		
	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ปริมาณสารสกัดหยาบ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลได้	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ปริมาณสารสกัดหยาบ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลได้
ใบ	100	32.0279	32.02	100	30.5034	30.50
กิ่ง	100	27.8308	27.83	100	28.7214	28.72
ก้าน	100	23.3001	23.30	100	27.2466	27.24

4.2 การหาสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากต้นจันอิน

4.2.1 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการทดลองวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้านของทั้ง 2 จังหวัด ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในการวิเคราะห์ใช้สารมาตรฐานคือกรดแกลลิก และใช้แบลงค์คือเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ดังแสดงในภาคผนวก ก-1

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นซึ่งมีปริมาณเทียบเท่ากับ 279.35 ± 53.35 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mgGAE/g สารสกัด) หรือ 8947.01 ± 1709.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ100 กรัมของสารสกัด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดสระบุรี และพบว่าสารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดสระบุรี มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ 31.65 ± 1.96 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mgGAE/g สารสกัด) หรือ 862.36 ± 53.56 mgGAE/100 g น้ำหนักแห้งสารสกัด

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วนต่าง ๆ จากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี

แหล่ง	สารสกัดหยาบ	mgGAE / g สารสกัด	mgGAE / 100 g น้ำหนักแห้งของพืช
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	279.35 ± 53.35^{a}	8947.01 ± 1709.00^{a}
	กิ่ง	128.96 ± 7.67^{bc}	3589.10 ± 234.17^{bc}
	ก้าน	101.44 ± 10.26^{cd}	2363.53 ± 285.60^{cd}
จังหวัดสระบุรี	ใบ	153.53 ± 7.86^{bc}	4683.32 ± 225.85^{bc}
	กิ่ง	187.93 ± 6.13^{b}	5397.82 ± 143.02^{b}
	ก้าน	31.65 ± 1.96^{d}	862.36 ± 53.56^{d}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกข้างต้นให้ผลสูงกว่าการทดลองของ Olga Grygorieva และคณะ (2018) ซึ่งได้ศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกในผลของลูกพลับอเมริกาซึ่งเป็นพืชในจีนัสเดียวกัน (*Diospyros Virginiana* L.) โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 พบว่าผลของลูกพลับอเมริกาทั้ง 6 จีโนไทป์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกตั้งแต่ 590.75 ถึง 1325.12 mgGAE/100 g น้ำหนักแห้งสารสกัด น่าจะเป็นผลมาจากตัวทำละลาย ชนิดของพืชและแหล่งพืช

4.2.2 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากใบ กิ่ง และก้าน ของต้นจันอิน

จากการทดลองการวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากใบ กิ่ง และก้าน ของต้นจันอิน ตามวิธีของ Kathirvel และ Sujatha (2012) จะได้ผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง ที่ 4.3

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.3 โดยใช้ควอซิตินเป็นสารมาตรฐาน พบว่าปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากส่วนใบมีมากที่สุด โดยใบจากจังหวัดสระบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบเท่า 975± 7.22 มิลลิกรัมควอซิตินต่อมิลลิกรัมของสารสกัด หรือ 29740.82 ± 220.14 มิลลิกรัมควอซิตินต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากส่วนใบของจังหวัดบุรีรัมย์ รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากส่วนกิ่งของทั้งสองจังหวัด และก้านจากทั้งสองจังหวัด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี

แหล่ง	สารสกัดหยาบ	mgQE / g สารสกัด	mgQE / 100 g น้ำหนักแห้ง
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	608.33 ± 27.32^{b}	19483.64 ± 875.09^{b}
	กิ่ง	562.50 ± 19.09^{b}	15654.83 ± 531.40^{c}
	ก้าน	116.67 ± 18.16^{d}	2718.35 ± 423.18^{e}
จังหวัดสระบุรี	ใบ	975.00 ± 7.22^{a}	29740.82 ± 220.14^{a}
	กิ่ง	237.50 ± 7.22^{c}	6821.33 ± 207.28^{d}
	ก้าน	108.33 ± 11.02^{d}	2951.72 ± 300.37^{e}

หมายเหตุ : ตัวอักษรเดียวกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ข้างต้นให้ผลสูงกว่ากับ Jittawan และคณะ (2010) ซึ่งได้ศึกษาการทดสอบสารประกอบพฤกษเคมีของผลไม้ป่าทั้ง 19 ชนิด โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 พบว่าส่วนผลของต้นจันอิน (*Diospyros decandra* lour.) มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุดถึง 187.27 ± 8.74 มิลลิกรัมรูตินต่อกรัมของสารสกัด และจากการศึกษาของ Onanong และคณะ (2019) พบว่าส่วนผลดิบและผลสุกของต้นจันอิน มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 545.20 ± 8.18 และ 579.12 ± 9.28 มิลลิกรัมรูตินต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ผลที่ได้จากการทดลองสูงกว่าอาจเป็นผลมาจากส่วนของพืช แหล่งที่เก็บพืช รวมถึงสารมาตรฐานที่ใช้แตกต่างกัน

4.2.3 การวิเคราะห์หาสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจัน อิน วิเคราะห์โดยวิธี Folin-Denis (Kathirvel และ sujatha, 2012) แสดงในตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณของสารแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน ส่วนใบ กิ่ง และก้าน

แหล่ง	สารสกัดหยาบ	mgTAE / g สารสกัด	mgTAE / 100 g น้ำหนักแห้ง
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	324.55 ± 25.04[a]	10394.83 ± 802.08[a]
	กิ่ง	250.11 ± 15.67[b]	6960.80 ± 436.22[b]
	ก้าน	190.11 ± 16.37[c]	4429.61 ± 381.37[c]
จังหวัดสระบุรี	ใบ	235.67 ± 1.93[b]	7188.63 ± 58.70[b]
	กิ่ง	150.11 ± 9.10[c]	4311.40 ± 261.22[c]
	ก้าน	183.45 ± 6.19[c]	4998.24 ± 168.56[c]

หมายเหตุ : ตัวอักษรเดียวกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.4 โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าปริมาณของสารแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจันอินจากส่วนใบพบมากที่สุด โดยใบจากจังหวัดบุรีรัมย์เทียบเท่า 324.55 ± 25.04 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัดหรือ 10394.83 ± 802.08 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ ใบจากจังหวัดสระบุรีและกิ่งจากจังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนกิ่งจากจังหวัดสระบุรีและก้านของทั้งสองจังหวัดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินข้างต้นให้ผลใกล้เคียงกับ Uddin และคณะ (2011) ซึ่งได้ศึกษาสารประกอบพฤกษเคมีของ Date plum (*Diospyros lotus* Stewart) ศึกษาส่วนของไม้เนื้อแข็ง ใบ ลำต้น และราก โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่ามีสารประกอบแทนนินในสารสกัดจากส่วนใบที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเอทิลอะซิเตทและเมทานอลเท่านั้น

4.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน (pH differential)

โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากส่วน ใบ กิ่ง และก้าน ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบด้วยวิธี pH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

differential โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบตัวอย่าง 1 ใน 9 ส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ KCl (0.0025 M, pH 1.0) และ CH_3COONa buffer (0.4 M, pH 4.5) จะได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี

แหล่ง	สารสกัดหยาบ	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารสกัด)
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	15.59 ± 8.69[a]
	กิ่ง	26.72 ± 9.30[a]
	ก้าน	55.11 ± 40.37[a]
จังหวัดสระบุรี	ใบ	27.28 ± 3.65[a]
	กิ่ง	20.60 ± 4.80[a]
	ก้าน	39.52 ± 27.74[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษรเดียวกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4.5 พบว่าปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน ส่วนก้านมีค่ามากที่สุด โดยก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์ เท่ากับ 55.11 ± 40.37 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารสกัด และก้านจากจังหวัดสระบุรี เท่ากับ 39.52 ± 27.74 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารสกัด รองลงมาคือส่วนกิ่ง และใบ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารแอนโทไซยานินจากทุกสารสกัดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

จากผลการวิเคราะห์หาสารประกอบแอนโทไซยานินข้างต้นให้ผลต่ำกว่างานวิจัยของ Supaphon และคณะ (2017) ซึ่งได้ศึกษาการสกัดแยกหาปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดหยาบจากลูกจันอิน โดยใช้ตัวทำละลายไฮโดรคลอริกในเมทานอลที่มีหลายความเข้มข้น ได้แก่ 0.1% 0.5% และ 1.0% และวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดหยาบนั้นโดยใช้วิธี pH-differential พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0% ไฮโดรคลอริก มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดเทียบเท่า 181.66 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นจันอินด้วยวิธี DPPH scavenging activity

นำสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging method) แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร สารต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชเป็นสารที่มีความเสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ ซึ่งสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลองจะกำจัดสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว โดยการให้ไฮโดรเจนทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ตารางที่ 4.6 แสดงร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH) ของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี

แหล่ง	สารสกัด	% DPPH Reduction			
		ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
		1.25	2.5	5.0	10
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	45.35 ± 0.47^{gh}	56.02 ± 0.37^{e}	71.10 ± 1.64^{d}	85.09 ± 0.10^{bc}
	กิ่ง	25.48 ± 0.37^{m}	50.32 ± 0.26^{f}	71.89 ± 0.21^{d}	87.21 ± 0.06^{b}
	ก้าน	37.84 ± 0.26^{j}	39.60 ± 0.68^{ij}	42.51 ± 0.73^{hi}	55.41 ± 0.48^{h}
จังหวัดสระบุรี	ใบ	40.08 ± 1.07^{ij}	54.50 ± 0.73^{e}	74.61 ± 1.60^{d}	82.97 ± 033^{c}
	กิ่ง	30.09 ± 0.87^{kl}	55.05 ± 1.95^{e}	72.55 ± 2.71^{d}	85.46 ± 0.18^{bc}
	ก้าน	27.79 ± 0.94^{lm}	32.15 ± 0.97^{k}	46.20 ± 3.10^{g}	51.11 ± 0.62^{f}
วิตามินอี 0.5 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร		91.64^{a}			

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในตารางแสดงถึงร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.6 พบว่าที่ความเข้มข้น 1.25 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบส่วนต่างๆ จากต้นจันอินทั้ง 2 จังหวัด เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า สารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยาบทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยที่ร้อยละของการดักจับอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้น

สารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่ความเข้มข้น 1.25 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์มากที่สุดคือ 85.09 ± 0.10 เปอร์เซ็นต์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 45.35 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 87.21 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์น้อยที่สุดที่ คือ 25.48 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 55.41 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดที่ คือ 37.84 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดสระบุรีที่ความเข้มข้น 1.25 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์มากที่สุดคือ 82.97 ± 033 เปอร์เซ็นต์ และมีฤทธิ์น้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 40.08 ± 1.07 เปอร์เซ็นต์

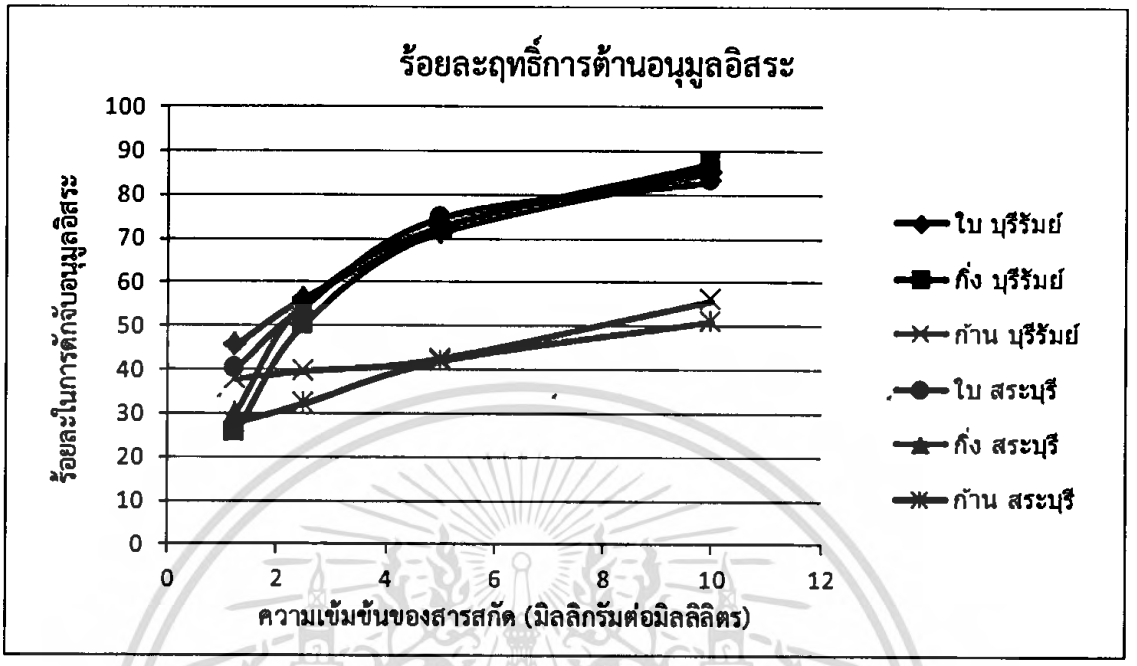
สารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดสระบุรีที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 85.46 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์น้อยที่สุดที่ คือ 30.09 ± 0.87 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดสระบุรีที่ความเข้มข้น 1.25 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์มากที่สุดคือ 51.11 ± 0.62 เปอร์เซ็นต์ และมีฤทธิ์น้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 27.79 ± 0.94 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทำการเปรียบเทียบส่วนต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบจากต้นจันอินทั้ง 2 จังหวัด พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบ และกิ่ง จากทั้งจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรีที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 87.21 ± 0.06 และสารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดคือ 25.48 ± 0.37 และจากรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบส่วนใบและกิ่งจากทั้ง 2 จังหวัด มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)



รูปที่ 4.1 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH Reduction) ระหว่างสารสกัดหยาบจากต้นจันอินที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่งจากปริมาณทั้งหมดดังนั้นหากสารสกัดหยาบมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมาก ค่า IC_{50} จะมีค่าน้อย

ตารางที่ 4.7 ค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนใบ กิ่ง และก้าน จากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี

แหล่ง	สารสกัดหยาบ	ค่า IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	1.38
	กิ่ง	3.32
	ก้าน	7.58
จังหวัดสระบุรี	ใบ	1.85
	กิ่ง	2.77
	ก้าน	9.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} จากตารางที่ 4.7 พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดโดยมีค่า IC_{50} น้อยที่สุดคือ 1.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองข้างต้น สารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดบุรีรัมย์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับการทดลองของ Ali Khan และคณะ (2016) ซึ่งได้ทำการทดสอบศักยภาพการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Diospyros blancoi* (Ebenaceae) โดยใช้ส่วนใบ เปลือกราก และลำต้น ซึ่งใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล พบว่าสารสกัดจากส่วนใบ เปลือกราก และลำต้น มีค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (%DPPH) สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 93.050 ± 1.003%, 95.430 ± 0.020% และ 95.760 ± 0.343% ตามลำดับ โดยสารสกัดจาก BHT เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและจากงานวิจัยของ Onanong และคณะ (2019) พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบและกิ่งของทั้งสองจังหวัดมีสารประกอบฟลาโวนอยด์เช่นเดียวกัน จึงสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบส่วนใบและกิ่งของทั้งสองจังหวัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้

4.4 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยวิธี MTT

จากการทดลองเพื่อวิเคราะห์หาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ของสารสกัดหยาบต้นจันอิน จากส่วน ใบ กิ่ง และก้าน จากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี โดยวิธี MTT ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม ที่มีปริมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดที่ใช้ทดลอง โดยเจือจางสารสกัดที่ใช้ให้มีความเข้มข้น 1 10 100 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของต้นจันอินทั้งสองจังหวัด ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.8 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบลดลง ส่งผลให้ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (% Cytotoxic) ลดลงไปด้วย และเมื่อทำการเปรียบเทียบส่วนต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบต้นจันอิน ทั้งสองจังหวัด พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดสระบุรี ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดคือ 85.64 ± 3.00 ซึ่งมีความแตกต่างกับสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดคือ 8.17 ± 0.18 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันกับสารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดสระบุรีอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์ ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดคือ 77.12 ± 0.27 และน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 8.17 ± 0.18 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กันทุกความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดบุรีรัมย์ ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดคือ 62.71 ± 0.35 และน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 30.65 ± 1.22 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์ ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดคือ 62.65 ± 1.29 และน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 26.78 ± 0.55 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดสระบุรี ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดคือ 85.64 ± 3.00 และน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 10.90 ± 1.08 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 10 100 และ 1,000 จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดสระบุรี ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดคือ 58.07 ± 0.82 และน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 32.54 ± 0.79 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 10 100 และ 1,000 จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดสระบุรี ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดคือ 67.37 ± 1.78 และน้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ30.44 ± 1.84 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 10 100 และ 1,000 จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

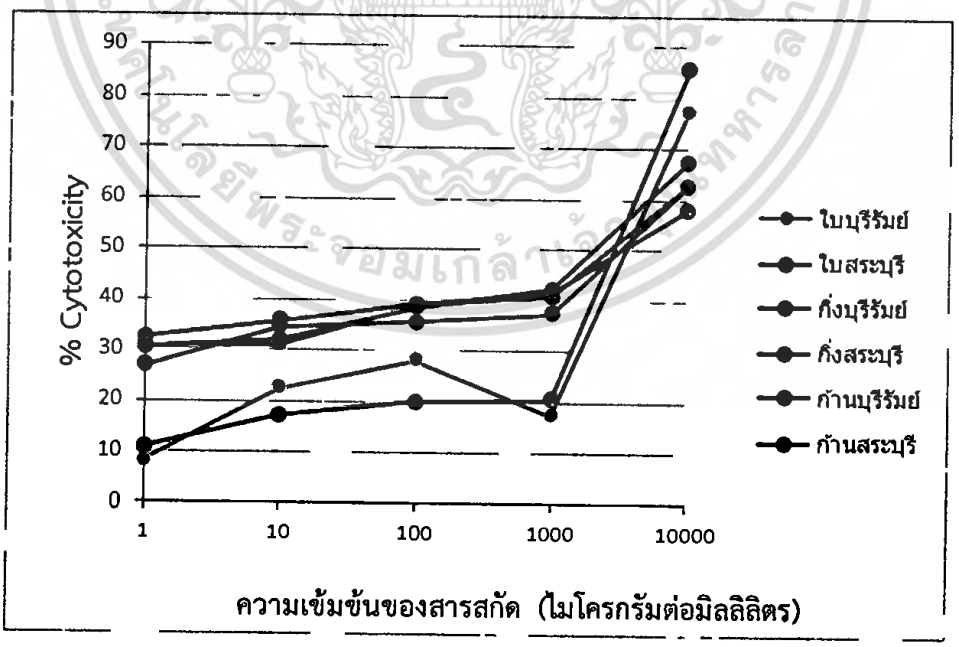
จากผลการทดลองจะพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้นโดยที่ความเข้มข้นช่วง 1-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบจากใบทั้งสองจังหวัดจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมค่อนข้างต่ำ แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างฉับพลันช่วงความเข้มข้นที่ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสารสกัดหยาบส่วนกิ่งและก้านของทั้งสองจังหวัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมสูงที่สุด ตามลำดับดังรูป 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนต่างๆ จากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี

แหล่ง	สารสกัด	% Cytotoxicity				
		ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				
		1	10	100	1000	10000
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	8.17±0.18 m	22.47±3.26 kl	28.01±3.44 j	17.39±5.03 l	77.12±0.27 b
	กิ่ง	30.65±1.22 ij	31.09±0.44 ij	39.03±2.47 efg	40.76±1.05 ef	62.71±0.35 cd
	ก้าน	26.78±0.55 jk	34.57±0.36 ghi	35.61±2.13 fghi	37.29±1.47 efgh	62.65±1.29 cd
จังหวัดสระบุรี	ใบ	10.90±1.08 m	17.12±1.12 l	19.97±1.64 l	20.40±1.61 l	85.64±3.00 a
	กิ่ง	32.54±0.79 hij	35.71±0.51 fghi	39.21±1.25 efg	41.66±0.84 e	58.07±0.82 d
	ก้าน	30.44±1.84 ij	32.16±1.96 hij	38.63±0.51 efg	42.30±1.67 e	67.37±1.78 c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในตารางแสดงถึงร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.2 กราฟเปรียบเทียบร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (%Cytotoxic) ระหว่างสารสกัดหยาบต้นจันอินความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1 10 100 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากส่วนใบ กิ่ง และก้าน จากจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ของสารสกัดหยาบจากส่วนใบ กิ่ง และก้าน จากทั้งสองจังหวัด สามารถแสดงในรูปของค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (Cytotoxic concentration 50% ; CC_{50}) จากการทดลองสารสกัดจากส่วนต่างๆของพืช มีค่า CC_{50} ดังตารางที่ 4.9 ซึ่งค่าที่ได้มาจากการคำนวณจากกราฟจากรูปภาคผนวก ฉ-1 ถึง ฉ-6 พบว่าสารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดสระบุรี มีค่า CC_{50} ต่ำที่สุดคือ 4,584.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดสระบุรี มีค่า CC_{50} สูงที่สุดคือ 6,090.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.9 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารสกัดหยาบต้นจันอินส่วนต่างๆ จากจังหวัดบุรีรัมย์ และสระบุรี

แหล่ง	สารสกัดหยาบ	ค่า CC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	5509.15
	กิ่ง	5350.34
	ก้าน	5772.33
จังหวัดสระบุรี	ใบ	4974.00
	กิ่ง	6090.45
	ก้าน	4584.54

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของต้นจันอินจากส่วนต่างๆ ของทั้งสองจังหวัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จากงานวิจัยของ Alex และคณะ (2012) ซึ่งได้ศึกษาสารสกัดผลดิบของต้น Gaub (*Diospyros peregrine*) ความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย เท่ากับ 37.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ เอ็น-บิวทานอล และ เมทานอล มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย เท่ากับ 61.27 และ 53.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลที่ได้จากการทดลองมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่างานวิจัยของ Alex และคณะ เนื่องจากชนิดของพืช ส่วนของพืช และตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง จึงทำให้ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายสูงขึ้นด้วย และจากการศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของพืชตระกูล *Diospyros* ทั้งหมด 62 ชนิด ที่สกัดด้วยเฮกเซน พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้นที่พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบของจังหวัดสระบุรีของต้นจันอินมีสารฟลาโวนอยด์เช่นกัน จึงสรุปได้ว่าพืชตระกูล *Diospyros* ทั้ง 62 ชนิดมีสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 เซลล์ Lymphocyte leukemia และเซลล์ Human KB ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าผลการทดลองของเรา เนื่องจากใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ซึ่งฤทธิ์ของสารฟลาโวนอยด์จะช่วยให้มีการยับยั้งการแบ่งตัวหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และมีการชักนำการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่าง รวมถึงการยับยั้งการพัฒนาและความรุนแรงของโรคมะเร็ง เช่น การแพร่กระจาย (metastasis) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การอักเสบที่เกี่ยวกับโรคมะเร็ง (cancer-related inflammation) และการดื้อยาแบบหลายขนานของเซลล์มะเร็ง (multidrug resistance) (วิภพ, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบส่วนใบและกิ่งของจังหวัดบุรีรัมย์และสระบุรี มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH คือ 85.07, 87.21, 82.97 และ 85.46 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบพฤกษเคมี โดยการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบแทนนินทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบของจังหวัดบุรีรัมย์มีปริมาณมากที่สุดเทียบเท่า 279.35 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด หรือ 8947.01 มิลลิกรัมแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และ 324.55 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัดหรือ 10394.83 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบของจังหวัดสระบุรีมีปริมาณมากที่สุดเทียบเท่า 608.33 มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด หรือ 29740.82 มิลลิกรัมควอซิตินต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อวิเคราะห์หาสารประกอบแอนโทไซยานินพบว่าสารสกัดหยาบส่วนก้านของจังหวัดบุรีรัมย์มีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 55.11 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารสกัด

นอกจากนี้ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (% Cytotoxicity) เพิ่มขึ้นไปด้วย โดยสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี มีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมมากที่สุด คือ 85.64 และสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี มีค่า CC_{50} ต่ำที่สุดคือ 4584.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการสกัดสารสกัดหยาบจากต้นจันอินอาจเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ ในการสกัด
2. ในการสกัดสารสกัดหยาบจากต้นจันอินอาจเลือกใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ผล เปลือก หรือราก สามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของสรรพคุณและทางด้านพฤกษเคมีเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์
3. ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์อาจจะใช้เซลล์มะเร็งชนิดอื่นในการทดสอบร่วมด้วย
4. สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอาหารและโภชนาการได้ เนื่องจากในสารสกัดหยาบจากต้นจันอินมีสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ จึงอาจนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมด้านสุขภาพได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กริช รัตนจันทร์ และจตุพล ชารีนาง. 2560. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์สารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากผักตบชวา.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จุฑาธิป กำแก้ว, บุษบา บัวเขียว และ รุ้งวรีย์ ทองธรรมชาติ. 2557. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากมะรุม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชลลดา โพธิ์ศรีทอง. 2545. การศึกษาทางพฤกษเคมีของต้นพญารากดำ (*Diospyros Rubra* Lec.). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นพวัฒน์ เพ็งคาศรี, จัตุพล กันทะมูล, ภัทราภรณ์ โตวัฒนกิจ, วชิรวิทย์ วงศ์ษารัฐ, วนิดา ใจหมั่น, นิภาพร เมืองจันทร์ และสุภารัตน์ จันทร์เหลือง. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 6(3) : 195-201.

วิภพ สุทธนะ.2556. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์ กลไกการออกฤทธิ์. ศรีนครินทร์เวชสาร. 28(4) : 567-582

อรุษา เชาวนลิขิต. 2554. การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 3(6) : 26-36.

อรรัมภา สืบสาววงษ์. 2559. การใช้ประโยชน์จากลูกจันในเครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์ และคณะ. 2562. สารหอมระเหยสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของลูกจัน (*Diospyros decandra* lour.). วารสารแก่นเกษตร. 47(1) : 1549-1556.

Angel T. Alex, Niranga Hansini Nawagamuwa, Alex Joseph, Josyula V. Rao, Jesil A. Mathew and Nayanabhirama Udupa. 2012. In vitro anti-cancer and anti-oxidant activity of different fractions of *Diospyros peregrina* unripe fruit extract. *Free Radicals and antioxidants*. 2(4) : 45-49.

Amelot, M. A., Bastidas, A. O. and Pisarelli, M. C. 2007. Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation and rain regime. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35 : 1 - 10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Comanidini, P., Lerma - García, M. J., Simó - Alfonso, E. F. and Toschi, T. G. 2014. Tannino analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC - DAD - MS. *Food Chemistry*. 157 : 290 - 295.

Ghias Uddin, Abdur Rauf, Bina Shaheen Siddiqui and Syed Qaise Shah. 2011. Preliminary Comparative Phytochemial Screening of *Diospyros lotus* Stewart. *Middle-East Journal of science research*. 10(1) : 78-81

Jang, I., Jo E., Bae, M., Lee, H., Jeon, G., Park, E., Yuk, H., Ahn and G. & Lee, S. 2010. Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruit. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(2) : 155 - 160.

Kubola, J., Siriamornpun and S. & Meeso, N. 2011. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*. 126 : 972-981

Muhammad Ali Khan *et al*. 2016. Comparative investigation of the radical sacavenging potential and anticancer property of *Diospyros blancoi* (Ebenaceae). *Journal of Tropical Biomedicine*. 6 : 410-417.

Naczyk, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of Phenolics. *Food Journal of Chromatography A*. 10(54) : 95 - 111.

Neamsuwan et al. 2018. Medicinal plants used for hypertension treatment by folk healers in Songkhla province, Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*. 214 : 58-70.

Olga Grygorieva, Alicja Zofia Kucharska , Narcyz Piórecki, Svitlana Klymenko, Olena Vergun and Ján Brindza. 2018. Antioxidant activities and phenolic compounds in fruits of various genotypes of American persimmon (*Diospyros Virginiana* L.). *Acta Scibutiarum Polonorum*. 17(2) : 117-124.

Fagan DH *et al*. 2012. MCF-7 Cells human breast adenocarcinoma cell line. [Online]. Available. http://www.mcf7.com. (สืบค้นเมื่อ 22 ธันวาคม 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Labieniec, M. and Gabryelak, T. 2003. Image of Chemistry structure tannin acid. [Online]. Available. http://www.themodernembalmer.com/tannin.htm. (สืบค้นเมื่อ 22 ธันวาคม 2561)

กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติธนะ. 2552. จันโอ-จันอิน กลิ่นหอมจรุงใจ. [Online]. Available. http://www.doctor.or.th/article/detail/7612. (สืบค้นเมื่อ 22 ธันวาคม 2561)

ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. *Diospyros decandra* Lour. [Online]. Available. http://www.qsbg.org/Database/Botanic_Book%20full%20option/search_page.a .(สืบค้นเมื่อ 22 ธันวาคม 2561)

ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2010. จันอิน จันโอ. [Online]. Available. http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=33. (สืบค้นเมื่อ 22 ธันวาคม 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic)

การวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารประกอบฟีนอลลิกมาตรฐาน โดยมีหลักการคือ สารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถติดตามโดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

1. สารเคมี

1.1 Folin-Ciocalteu reagent

1.2 โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์

1.3 สารละลายกรดแกลลิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้นเริ่มต้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 นำมาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1 0.1 0.01 และ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใส่ลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2.4 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.5 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.6 นำมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

2.7 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิกในหน่วยไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

3.1 เตรียมสารสกัดหยาบให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 ปิเปตสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 well plate

3.3 ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1 0.1 0.01 และ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4 จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร

3.5 เติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.6 บ่ม 30 นาที แล้วนำมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

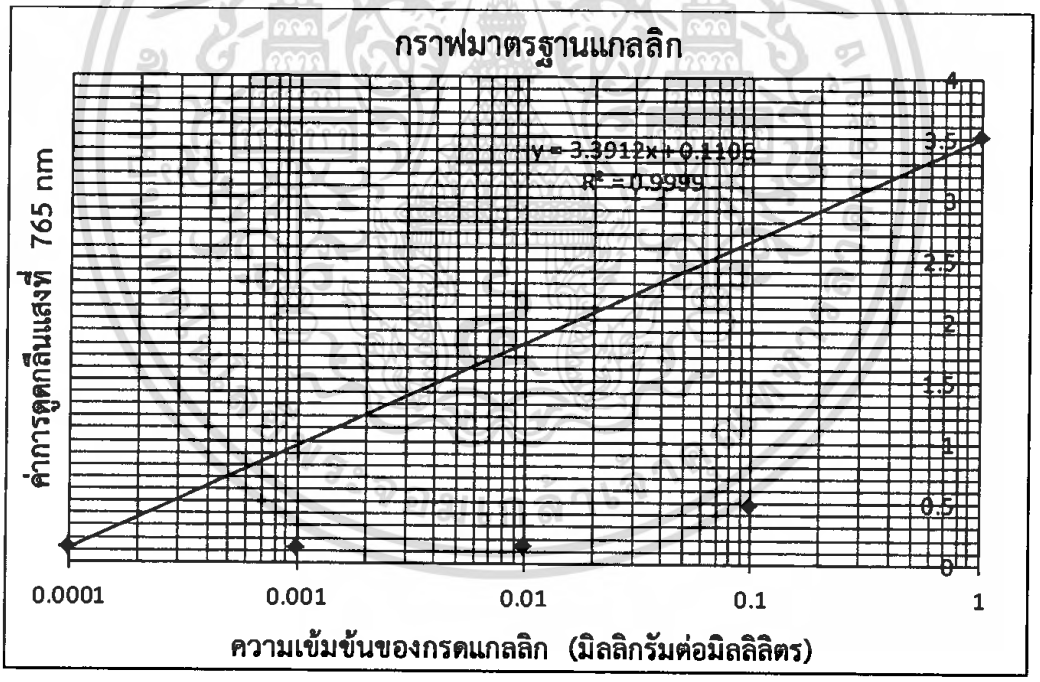
ตาราง ก-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร
1	3.5
0.1	0.469
0.01	0.134
0.001	0.112
0.0001	0.106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ก-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบของต้นจันอินส่วน ใบ กิ่ง และก้าน จากจังหวัดบุรีรัมย์และจังหวัดสระบุรี

สารสกัดหยาบ		ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	ปริมาณฟีนอลิก (mgGAE/100 g dry weight)	ปริมาณฟีนอลิก (mgGAE/g สารสกัด)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3			
จังหวัดบุรีรัมย์	ใบ	0.197	0.179	0.24	0.2053	8935.78	279
	กิ่ง	0.148	0.16	0.155	0.1543	3584.60	128.8
	ก้าน	0.148	0.141	0.146	0.145	2362.63	101.4
จังหวัดสระบุรี	ใบ	0.163	0.167	0.158	0.1626	4676.17	153.3
	กิ่ง	0.177	0.177	0.169	0.1743	5393.87	187.8
	ก้าน	0.12	0.122	0.122	0.1213	858.26	31.5
ค่าเฉลี่ย Blank		0.1125					



รูปที่ ก-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของกรดแกลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณ

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก Y = 3.3912x + 0.1106

เมื่อ Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

X คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่คำนวณจากกราฟมาตรฐาน หน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนหน่วยจากไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด

ตัวอย่างการคำนวณ

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

$$Y = 3.3912x + 0.1106$$

$$0.2053 = 3.3912x + 0.1106$$

$$X = (0.2053 - 0.1106) / 3.3912$$

$$X = 0.0279$$

ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วนใบ 0.1 มิลลิกรัม เทียบเท่ากับปริมาณเนื้อสารของสารมาตรฐานกรดแกลลิก 0.0279 มิลลิกรัม

สารสกัด 1,000 มิลลิกรัม จะมีปริมาณเทียบเท่าเนื้อสารของแกลลิก เท่ากับ (0.0279 x 1,000)/ 0.1 เท่ากับ 279 มิลลิกรัม สารสกัด 1 มิลลิกรัม จะมีปริมาณเทียบเท่ากับเนื้อสารของกรดแกลลิก เท่ากับ 279/1,000 เท่ากับ 0.0279 มิลลิกรัม

ดังนั้น สารสกัดหยาบจากส่วนใบของต้นจันอินมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 279 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ DPPH Radical Scavenging Assay

1. การเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ DPPH Radical Scavenging Assay

1.1 ชั่งสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน อย่างละ 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบแต่ละส่วนเป็น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 นำมาเจือจางโดยลดความเข้มข้นลงทีละครึ่ง (two-fold dilution) จนได้ความเข้มข้นเป็น 5 2.5 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย DPPH ใน Absolute Ethanol

โดยการชั่ง DPPH 0.039 กรัม ละลายใน Absolute Ethanol ปริมาตร 100 มิลลิตร จะได้สารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

หมายเหตุ: 1. ควรเตรียมสารละลาย DPPH ทันทีก่อนนำไปใช้

2. คำนวณความเข้มข้นของ DPPH (น้ำหนักโมเลกุล DPPH = 394.33)

$$cv/1000 = g/MW$$

$$g = (cv \times MW)/1000$$

$$= (0.1 \times 10^{-4} \times 394.33)/1000$$

$$= 0.039$$

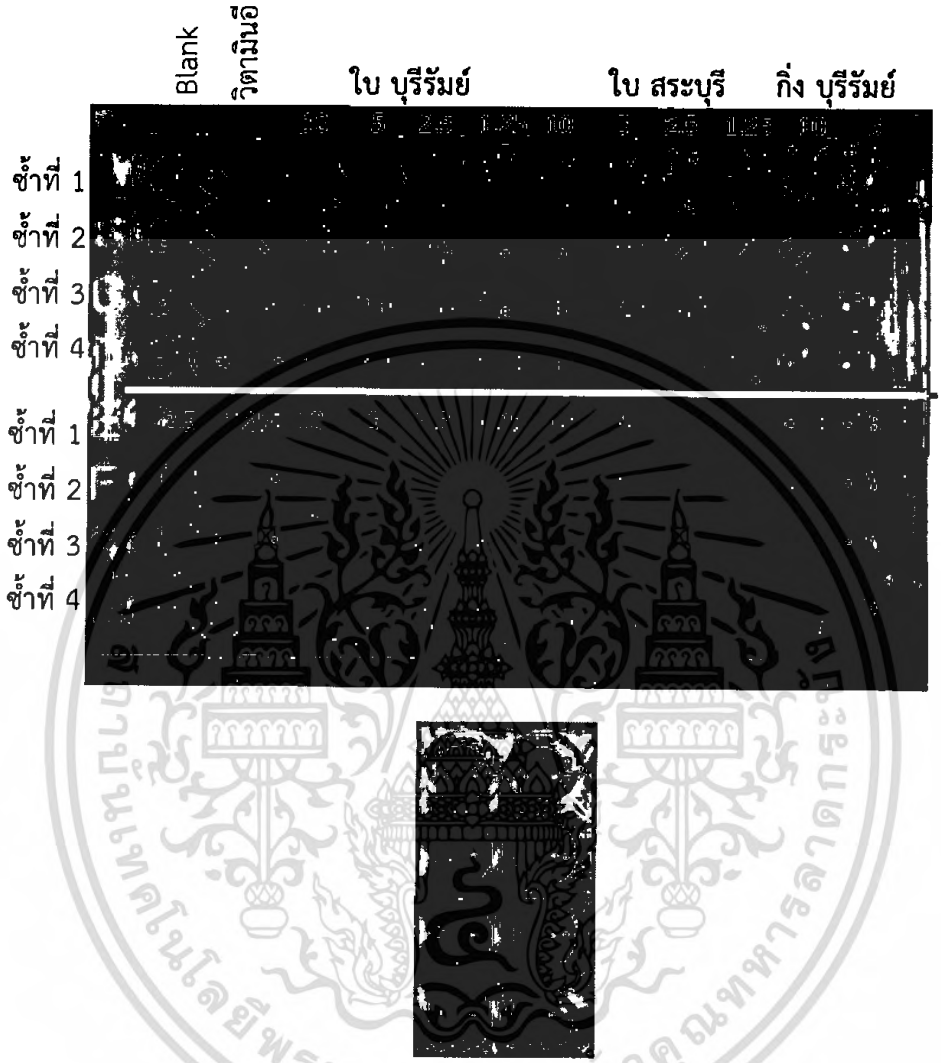
3. การเตรียมสารละลายวิตามินอี (Alpha-tocopherol)

การเตรียมสารละลายวิตามินอี หรือ α-tocopherol ความเข้มข้น 500 ไมโครโมล โดยทำการชั่งวิตามินอี 0.0043 กรัม ละลายใน Absolute Ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

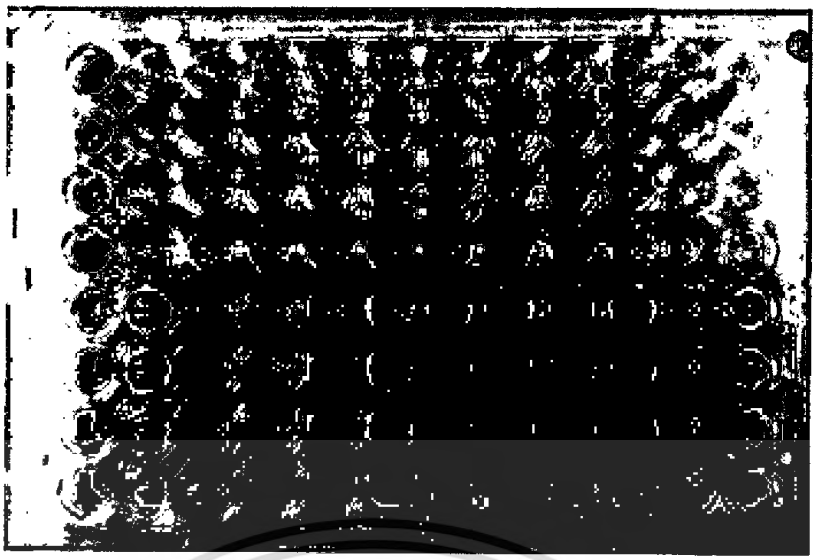
4. การเตรียมสารละลายวิตามินอี

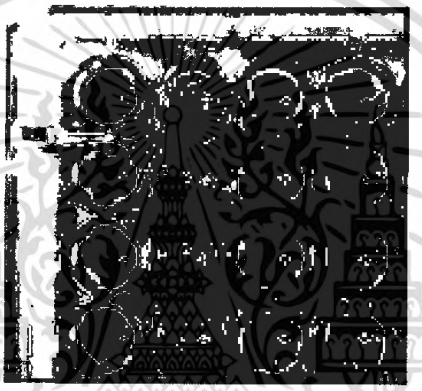
การเตรียมสารละลายวิตามินอี หรือ L-ascorbic aciderol ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 500 ไมโครลิตร โดยใช้ Absolute Ethanol เป็นตัวทำละลาย



รูปที่ ข-1 การเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





รูปที่ ข-2 การเกิดปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้าน

ตัวอย่างการคำนวณ

สารสกัดหยาบส่วนใบจากบุรีรัมย์ ซ้ำที่ 1 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากสมการ % DPPH radical = [(A-B)/A] x 100

= [(0.55025 – 0.082)/0.55025)] x 100

= 85.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร					
	จังหวัดบุรีรัมย์			จังหวัดสระบุรี		
	ใบ	กิ่ง	ก้าน	ใบ	กิ่ง	ก้าน
1.25	0.305	0.406	0.337	0.327	0.378	0.398
	0.296	0.411	0.346	0.341	0.382	0.388
	0.301	0.413	0.343	0.321	0.394	0.406
เฉลี่ย	0.301	0.410	0.342	0.329	0.384	0.397
2.5	0.245	0.276	0.339	0.251	0.260	0.363
	0.238	0.271	0.333	0.257	0.256	0.376
	0.243	0.273	0.325	0.243	0.226	0.381
เฉลี่ย	0.242	0.273	0.332	0.250	0.247	0.373
5	0.145	0.154	0.310	0.148	0.156	0.310
	0.156	0.153	0.316	0.122	0.174	0.316
	0.176	0.157	0.323	0.149	0.123	0.332
เฉลี่ย	0.159	0.154	0.316	0.139	0.151	0.319
10	0.082	0.070	0.243	0.095	0.081	0.263
	0.083	0.070	0.240	0.090	0.078	0.269
	0.081	0.071	0.245	0.096	0.081	0.275
เฉลี่ย	0.082	0.070	0.242	0.093	0.080	0.269
ค่าเฉลี่ย Blank	0.55025					

ตารางที่ ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของวิตามินอีและค่าร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี (Positive control)

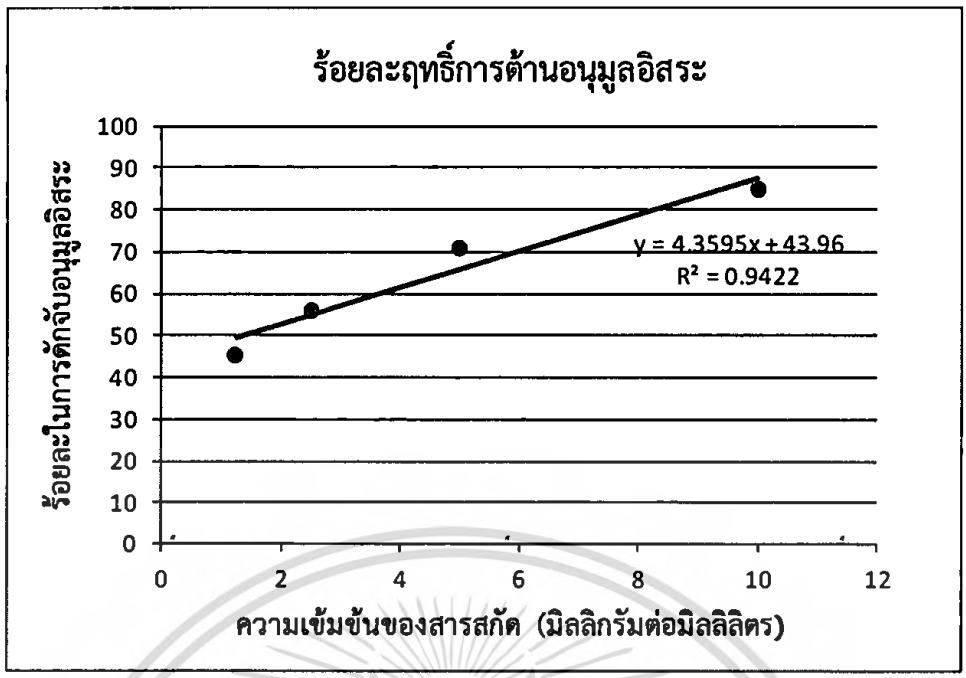
วิตามินอี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร	ร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
0.5 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร	0.046	91.640

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

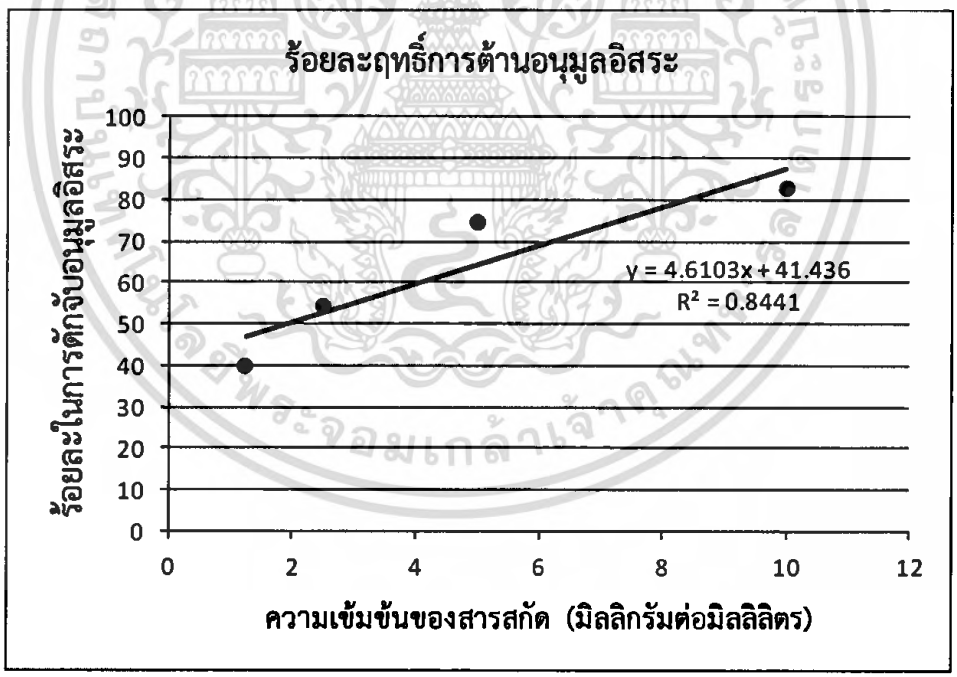
ตารางที่ ข-3 ค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ ส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร					
	จังหวัดบุรีรัมย์			จังหวัดสระบุรี		
	ใบ	กิ่ง	ก้าน	ใบ	กิ่ง	ก้าน
1.25	44.57	26.21	38.76	40.57	31.30	27.67
	46.20	25.30	37.12	38.02	30.58	29.49
	45.29	24.94	37.66	41.66	28.40	26.22
เฉลี่ย	45.35	25.48	37.84	40.08	30.09	27.79
2.5	55.47	49.84	38.39	54.38	52.75	34.03
	56.74	50.74	39.48	53.29	53.48	31.67
	55.83	50.38	40.94	55.83	58.93	30.76
เฉลี่ย	56.02	50.32	39.60	54.50	55.05	32.15
5	73.64	72.01	43.66	73.10	71.65	43.66
	71.64	72.19	42.57	77.82	68.38	52.39
	68.01	71.46	41.30	72.92	77.65	42.57
เฉลี่ย	71.10	71.89	42.51	74.61	72.55	41.96
10	85.09	87.27	54.93	82.73	85.28	52.20
	84.91	87.27	55.84	83.64	85.82	51.11
	85.27	87.09	55.47	82.55	85.28	50.02
เฉลี่ย	85.09	87.21	55.89	82.97	85.46	51.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

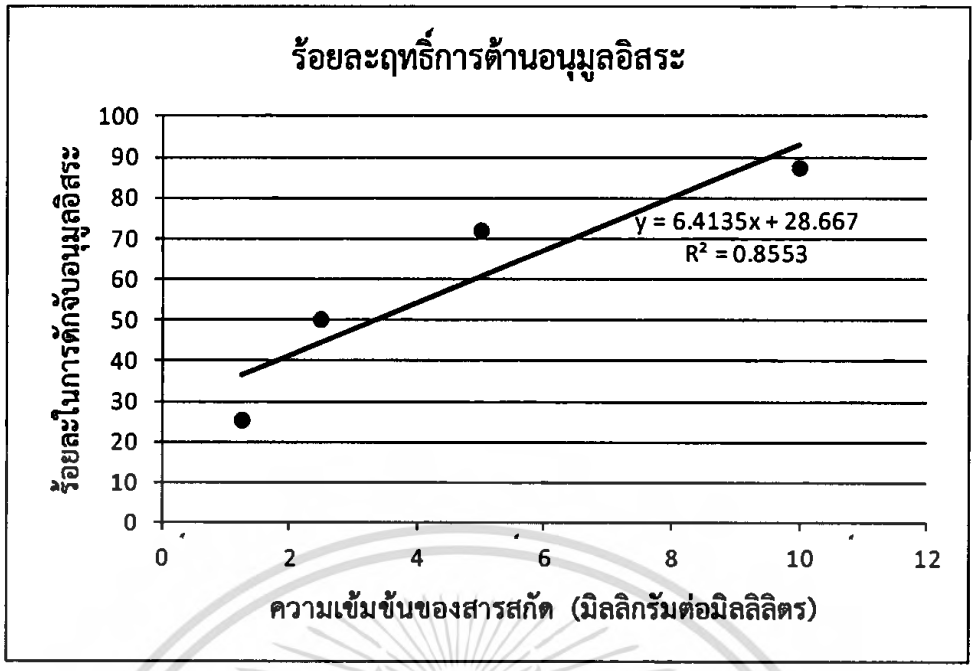


รูปที่ ข-3 การแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์

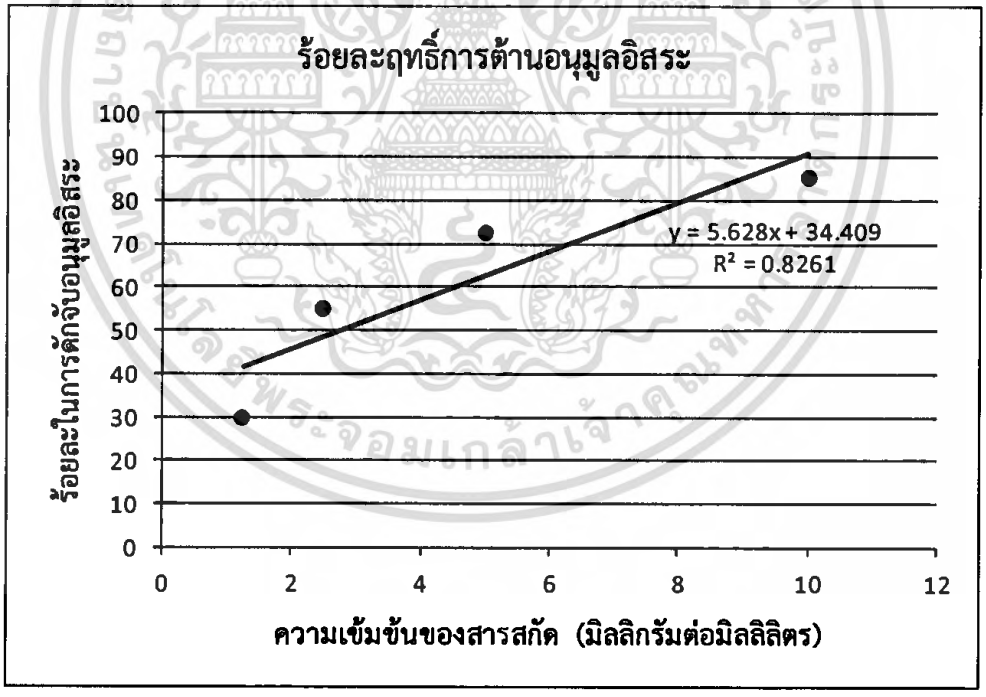


รูปที่ ข-4 การแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

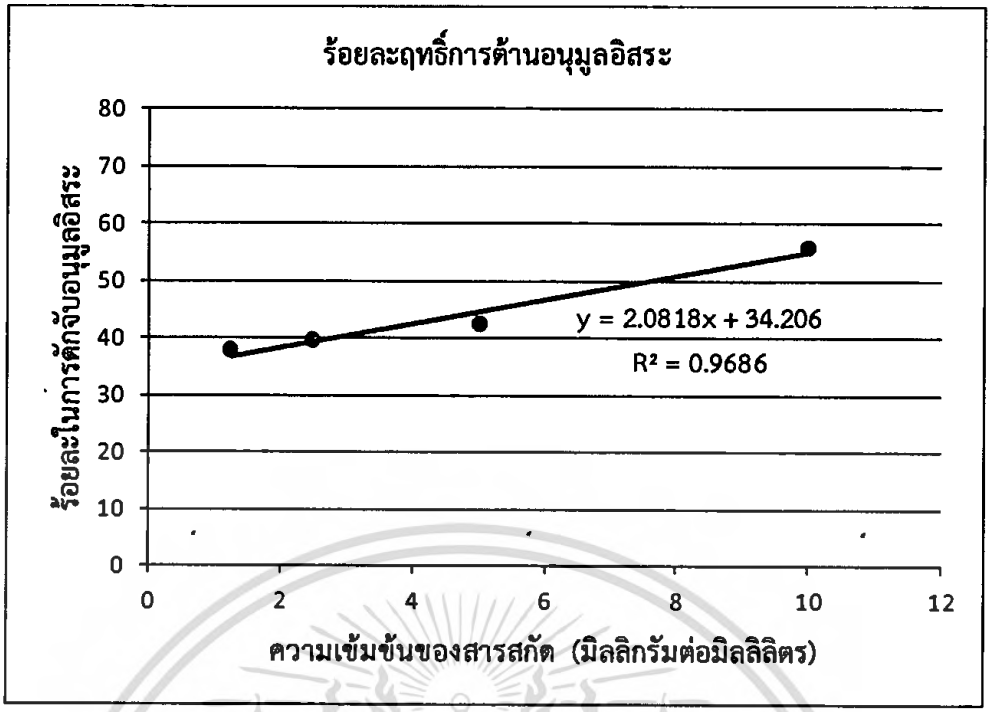


รูปที่ ข-5 การแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์

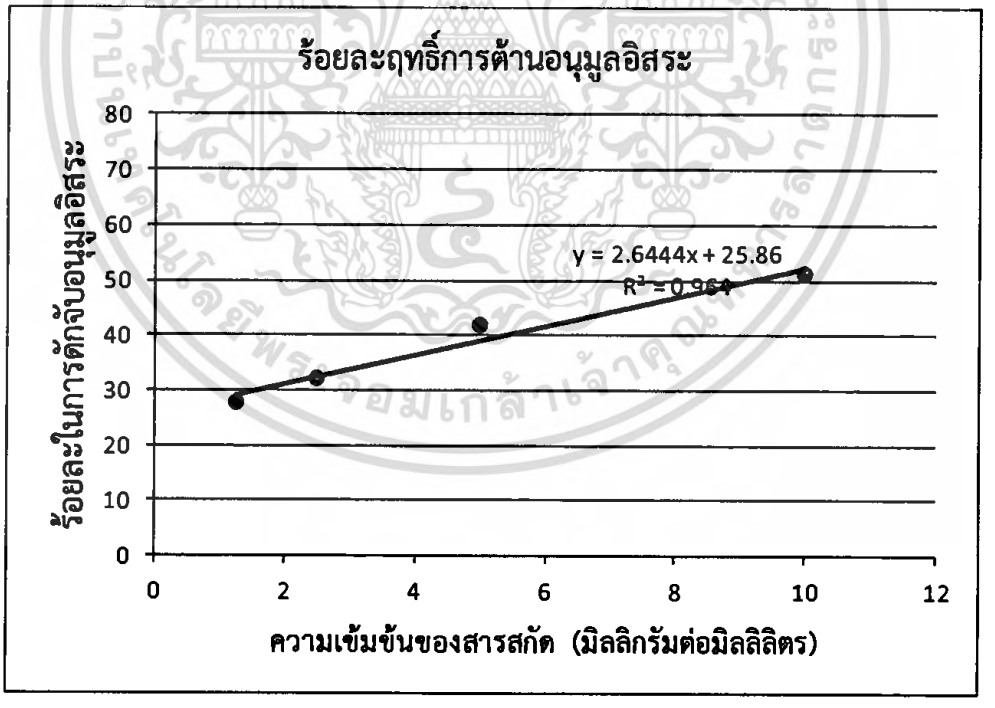


รูปที่ ข-6 การแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-7 การแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินจากจังหวัดบุรีรัมย์



รูปที่ ข-8 การแสดงการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินจากจังหวัดสระบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้สารละลายควอซิตินเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์มาตรฐาน ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้การวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

1. **สารเคมี**
   - 1.1 สารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30
   - 1.2 สารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 5
   - 1.3 สารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10
   - 1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์
2. **การเตรียมกราฟมาตรฐานควอซิติน**
   - 2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานควอซิตินเข้มข้นเริ่มต้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
   - 2.2 นำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
   - 2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานควอซิตินที่ละลายในเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใส่ลงหลอดทดลอง 250 ไมโครลิตร
   - 2.4 เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร
   - 2.5 เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร รอ 5 นาที
   - 2.6 เติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร รอ 6 นาที
   - 2.7 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร
   - 2.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 510 นาโนเมตร
   - 2.9 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารละลายควอซิตินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. **การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด**
   - 3.1 ชั่งสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
   - 3.2 ปิเปตสารสกัดปริมาตร 250 ไมโครลิตร
   - 3.3 เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร
   - 3.4 เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร รอ 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

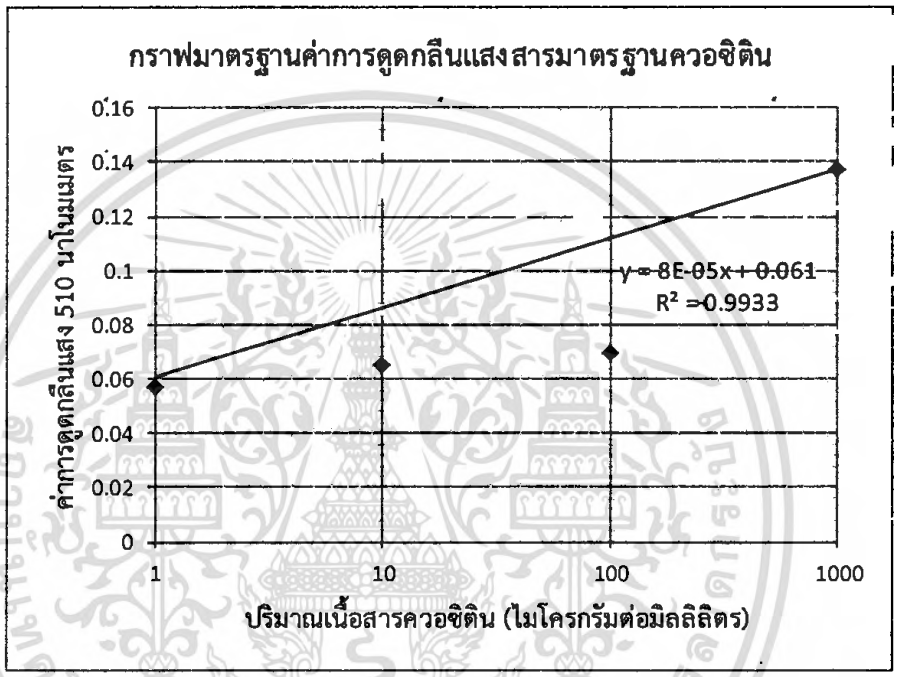
3.5 เติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร รอ 6 นาที

3.6 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร

3.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 510 นาโนเมตร

3.8 รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด

4. การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารควอซิตินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานควอซิตินที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

ความเข้มข้นควอซิติน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร		
	1	2	เฉลี่ย
1000	0.148	0.127	0.1375
100	0.068	0.071	0.0695
10	0.066	0.064	0.065
1	0.059	0.055	0.057

ตารางที่ ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ ใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอินที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	0.114	0.108	0.107	0.110
ใบ (สระบุรี)	0.14	0.138	0.139	0.139
กิ่ง (บุรีรัมย์)	0.108	0.107	0.103	0.106
กิ่ง (สระบุรี)	0.081	0.08	0.079	0.080
ก้าน (บุรีรัมย์)	0.07	0.073	0.068	0.070
ก้าน (สระบุรี)	0.068	0.071	0.07	0.070

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalents (QE/g of extract) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด)			
	1	2	3	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	662.5	587.5	575.0	608.33
ใบ (สระบุรี)	987.5	962.5	975.0	975.00
กิ่ง (บุรีรัมย์)	587.5	575.0	525.0	562.50
กิ่ง (สระบุรี)	250.0	237.5	225.0	237.50
ก้าน (บุรีรัมย์)	112.5	150.0	87.5	116.67
ก้าน (สระบุรี)	87.5	125.0	112.5	108.33

จากสมการกราฟมาตรฐาน

$Y = 8E\text{-}05x + 0.061 \quad R^2 = 0.9933$

เช่น ใบ (บุรีรัมย์) ซ้ำที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.114

$0.114 = 8E\text{-}05x + 0.061$

$x = 662.5$

ในสมการสารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 mg/ml มีฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 662.5 $\mu gQE.g^{-1}$

สารสกัดตัวอย่าง 1 mg มีค่ามิลลิกรัมของควอซิติน 662.5 µg

สารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มิลลิกรัมของควอซิติน เท่ากับ (0.6625 x 1,000 mg)/(1 mg) = 662.5 $mgQE.g^{-1}$

ดังนั้นพบว่า สารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด เท่ากับ 662.5 มิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง (mg of quercetin equivalents (QE/100 g dry weight) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	21,218.48	18,816.39	18,416.04	19,483.64
ใบ (สระบุรี)	30,122.11	29,359.52	29,740.82	29,740.82
กิ่ง (บุรีรัมย์)	16,350.60	16,002.71	14,611.17	15,654.83
กิ่ง (สระบุรี)	7,180.35	6,821.33	6,462.32	6,821.33
ก้าน (บุรีรัมย์)	2,621.26	3,495.02	2,038.76	27,18.35
ก้าน (สระบุรี)	2,384.08	3,405.83	3,065.24	2,951.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆ จากต้นจันอิน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆ จากต้นจันอิน จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Denis นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalent) (TAE/g of extract)

1. **สารเคมี**
   - 1.1 สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30
   - 1.2 สารละลาย Folin-Denis reagent
   - 1.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 35
   - 1.4 สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก
2. **การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแทนนิก**
   - 2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก โดยนำมาชั่ง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 เป็นตัวทำละลาย
   - 2.2 ทำการเจือจางสารละลายกรดแทนนิกที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
   - 2.3 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร
   - 2.4 เติมสารละลาย Folin - Denis reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
   - 2.5 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 35 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
   - 2.6 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
   - 2.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร
   - 2.8 สารละลายมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแทนนิกกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดแทนนิก จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน
3. **การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมด**
   - 3.1 เตรียมสารสกัดหยาบ โดยนำแต่ละส่วนของสารสกัดมาชั่ง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 เป็นตัวทำละลาย ดูดมาใช้ 50 ไมโครลิตร
   - 3.2 เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 7.5 มิลลิลิตร
   - 3.3 เติมสารละลาย Folin-Denis reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

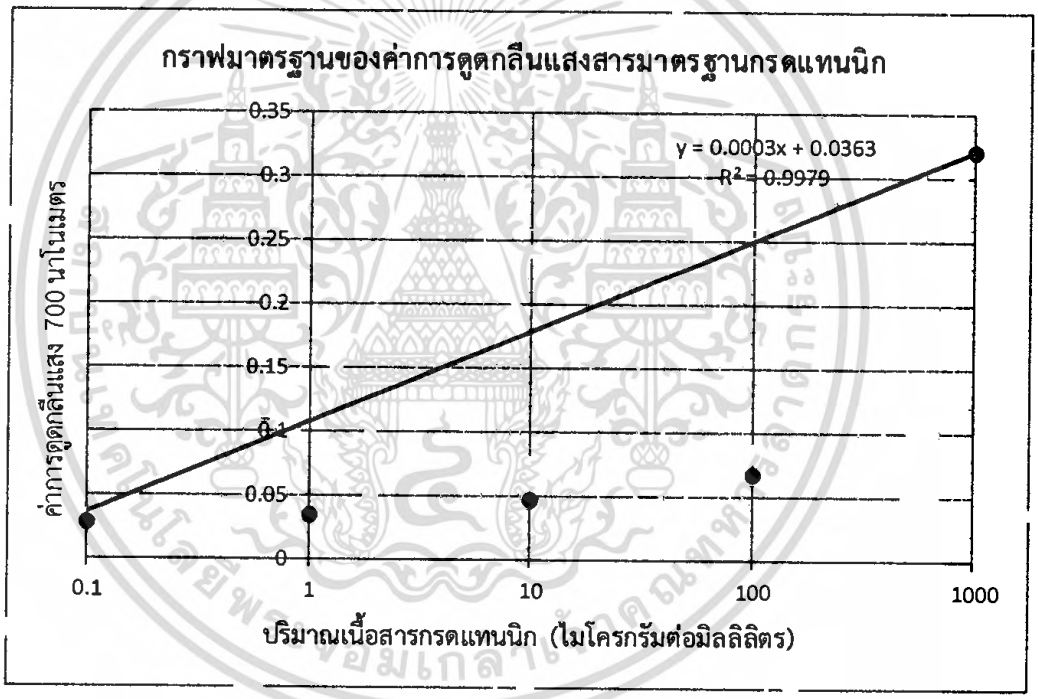
3.4 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 35 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับค่าของกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิก

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจันอินโดยวิธี Folin-Denish (Kathirvel and Sujatha, 2012) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารละลายมาตรฐาน โดยรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalent (TAE)/g of extract) และใช้เอทานอลร้อยละ 30 เป็นแบลงค์ (blank)



รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรกับปริมาณเนื้อสารของกรดแทนนิกในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกรดแทนนิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร					
	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
0.1	0.025	0.026	0.034	0.030	0.028	0.029
1	0.036	0.036	0.031	0.034	0.033	0.034
10	0.049	0.049	0.043	0.047	0.045	0.047
100	0.065	0.065	0.068	0.071	0.071	0.068
1000	0.327	0.320	0.317	0.328	0.311	0.321

ตารางที่ ง-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน

สารสกัดหยาบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	0.147	0.133	0.121	0.134
ใบ (สระบุรี)	0.107	0.108	0.106	0.107
กิ่ง (บุรีรัมย์)	0.115	0.117	0.102	0.111
กิ่ง (สระบุรี)	0.076	0.085	0.083	0.081
ก้าน (บุรีรัมย์)	0.103	0.09	0.087	0.093
ก้าน (สระบุรี)	0.090	0.095	0.089	0.091

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-3 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalents (TAE)/g of extract) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสมการกราฟมาตรฐาน

สารสกัดหยาบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารแทนนิน (มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด)			
	1	2	3	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	369.00	322.33	282.33	324.55
ใบ (สระบุรี)	235.67	239.00	232.33	235.67
กิ่ง (บุรีรัมย์)	262.33	269.00	219.00	250.11
กิ่ง (สระบุรี)	132.33	162.33	155.67	150.11
ก้าน (บุรีรัมย์)	222.33	179.00	169.00	190.11
ก้าน (สระบุรี)	179.00	195.67	175.67	183.45

จากสมการกราฟมาตรฐาน

$$y = 0.0003x + 0.0363 \quad , \quad R^2 = 0.9979$$

เช่น ใบ (บุรีรัมย์) มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.147 จะได้

$$0.147 = 0.0003x + 0.0363$$

$$x = 369$$

ในสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีแทนนินทั้งหมด เท่ากับ 369 $\mu gTAE.g^{-1}$

สารสกัดตัวอย่าง 1 mg มีค่ามิลลิกรัมของกรดแทนนิก เท่ากับ 369 µg

สารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมของกรดแทนนิก เท่ากับ (0.369 mg x 1,000 mg)/1 mg จะได้ 369 $mgTAE.g^{-1}$

ดังนั้น สารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg ค่ามิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัดเท่ากับ 369 มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-4 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (mg of tannic acid equivalents (TAE)/100 g of dry weight) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสมการกราฟมาตรฐาน

สารสกัดหยาบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารแทนนิน (มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	11,818.30	10,323.66	9,042.54	10,394.83
ใบ (สระบุรี)	7,188.63	7,290.31	7,086.96	7,188.63
กิ่ง (บุรีรัมย์)	7,300.95	7,486.49	6,094.95	6,960.80
กิ่ง (สระบุรี)	3,800.80	4,662.44	4,470.96	4,311.40
ก้าน (บุรีรัมย์)	5,180.39	4,170.72	3,937.72	4,429.61
ก้าน (สระบุรี)	4,877.14	5,331.25	4,786.32	4,998.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมดในส่วนต่างๆ ของต้นจันอินโดยใช้วิธี pH differential

โดยใช้ระบบ 2 บัฟเฟอร์ คือ 1 M potassium chloride (KCl) ที่ pH 1.0 และ 0.1 โมลาร์ sodium acetate (CH_3COONa) ที่ pH 4.5

1. **สารเคมี**

   1.1 โดยใช้ระบบ 2 บัฟเฟอร์ คือ 1 โมลาร์ potassium chloride (KCl) ที่ pH 1.0

   1.2 0.1 M sodium acetate (CH_3COONa) ที่ pH 4.5

   1.3 potassium chloride และ sodium acetate

2. **การวิเคราะห์สารประกอบแอนโทไซยานิน**

   2.1 นำสารลายของสารสกัด ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ชั่งสารสกัด 40 ไมโครกรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร)

   2.2 เจือจางเจือจางสารสกัดตัวอย่าง 1 ส่วนใน 9 ส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยวิธี pH differential โดยใช้ 2 ระบบ บัฟเฟอร์ คือ 1 โมลาร์ potassium chloride (KCl) ที่ pH 1.0 และ 0.1 โมลาร์ sodium acetate (CH_3COONa) ที่ pH 4.5 ปริมาตร 270 ไมโครลิตรของตัวอย่าง

   2.3 ผสมกับ potassium chloride หรือ sodium acetate ปริมาตร 270 ไมโครลิตร

   2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสง

$$A = (A520 - A700) \text{ ที่ pH } 1.0 - (A520 - A700) \text{ ที่ pH } 4.5$$

$$\text{ปริมาณ Anthocyanin (mg/l)} = (A \times MW \times DF \times 1{,}000)/(e \times 1)$$

เมื่อ A คือ ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ pH แตกต่างกัน

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอนโทไซยานิน (449.2)

DF คือ dilution factor

E คือ Cyanidin-3-glucoside molar absorbance (26,900)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์หาสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน โดยใช้วิธี pH-differential

ตารางที่ จ-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารประกอบแอนโทไซยานินจากส่วนต่างๆ ของต้นจันอิน

สารสกัดหยาบ	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรของสารสกัด
ใบ (บุรีรัมย์)	15.59 ± 8.69[a]
ใบ (สระบุรี)	27.28 ± 3.65[a]
กิ่ง (บุรีรัมย์)	26.72 ± 9.30[a]
กิ่ง (สระบุรี)	20.60 ± 4.80[a]
ก้าน (บุรีรัมย์)	55.11 ± 40.37[a]
ก้าน (สระบุรี)	39.52 ± 27.74[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษรเดียวกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางที่ จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	0.121	0.072	0.130	0.061	0.063	0.065
ใบ (สระบุรี)	0.242	0.323	0.239	0.235	0.245	0.240
กิ่ง (บุรีรัมย์)	0.161	0.168	0.154	0.140	0.186	0.162
กิ่ง (สระบุรี)	0.093	0.102	0.062	0.067	0.087	0.082
ก้าน (บุรีรัมย์)	0.057	0.050	0.054	0.059	0.066	0.057
ก้าน (สระบุรี)	0.081	0.069	0.056	0.061	0.042	0.062

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	0.110	0.057	0.100	0.048	0.048	0.051
ใบ (สระบุรี)	0.194	0.273	0.220	0.219	0.218	0.213
กิ่ง (บุรีรัมย์)	0.148	0.130	0.137	0.166	0.134	0.137
กิ่ง (สระบุรี)	0.100	0.059	0.058	0.052	0.061	0.058
ก้าน (บุรีรัมย์)	0.042	0.041	0.041	0.045	0.071	0.042
ก้าน (สระบุรี)	0.079	0.047	0.045	0.061	0.036	0.054

ตารางที่ จ-4 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH_3COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	0.115	0.085	0.073	0.079	0.075	0.078
ใบ (สระบุรี)	0.270	0.234	0.237	0.280	0.243	0.238
กิ่ง (บุรีรัมย์)	0.126	0.102	0.099	0.113	0.114	0.107
กิ่ง (สระบุรี)	0.074	0.103	0.076	0.066	0.032	0.080
ก้าน (บุรีรัมย์)	0.051	0.061	0.051	0.054	0.031	0.050
ก้าน (สระบุรี)	0.045	0.047	0.032	0.029	0.029	0.036

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH_3COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	0.089	0.080	0.061	0.056	0.060	0.069
ใบ (สระบุรี)	0.241	0.202	0.195	0.276	0.215	0.213
กิ่ง (บุรีรัมย์)	0.092	0.091	0.094	0.114	0.071	0.092
กิ่ง (สระบุรี)	0.069	0.070	0.061	0.060	0.024	0.065
ก้าน (บุรีรัมย์)	0.117	0.039	0.042	0.054	0.023	0.040
ก้าน (สระบุรี)	0.06	0.077	0.023	0.022	0.022	0.041

สูตรการคำนวณ $A = (A_{520} - A_{700})$ ที่ pH 1.0 – $(A_{520} - A_{700})$ ที่ pH 4.5

ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/l) = $(A \times MW \times DF \times 1{,}000)/(\varepsilon \times 1)$

เมื่อ A คือ ความแตกต่างของ Absorbance ที่ pH แตกต่างกัน

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอนโทไซยานิน (449.2)

DF คือ dilution factor

ε คือ cyaniding-3-glucoside molar absorbance (26,900)

ตารางที่ จ-6 ค่าเฉลี่ยการหาสารประกอบแอนโทไซยานิน (mg cyaniding-3-glucoside/l crude extract)

สารสกัดหยาบ	เฉลี่ย
ใบ (บุรีรัมย์)	15.59
ใบ (สระบุรี)	27.28
กิ่ง (บุรีรัมย์)	26.72
กิ่ง (สระบุรี)	20.60
ก้าน (บุรีรัมย์)	55.11
ก้าน (สระบุรี)	39.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (MCF-7 Cell)

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (Roswell Part Memorial Institute Media) ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

โดยนำอาหาร RPMI ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 5 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมากรองผ่าน Membrane filter ขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อทำการฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม Phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Nacl	8.0 กรัม
KCl	2.0 กรัม
KH_2HPO_4	0.2 กรัม
Na_2HPO_4	2.9 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

นำสารเคมีที่ทำการเตรียมไว้ใส่ลงในบีกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้งคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมไปทำการฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และทิ้งให้เย็นแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร MTT ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1% PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดหยาบส่วนใบ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
จังหวัดบุรีรัมย์	10000	0.399	0.388	0.385
	1000	1.368	1.448	1.180
	100	1.236	1.200	1.058
	10	1.260	1.337	1.159
	1	1.476	1.483	1.473
จังหวัดสระบุรี	10000	0.222	0.197	0.350
	1000	1.284	1.329	1.241
	100	1.244	1.297	1.333
	10	1.301	1.351	1.357
	1	1.468	1.423	1.412
control		1.5762		

ตารางที่ ฉ-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดหยาบส่วนกิ่ง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
จังหวัดบุรีรัมย์	10000	1.053	1.033	1.020
	1000	1.604	1.590	1.681
	100	1.765	1.707	1.543
	10	1.900	1.861	1.894
	1	1.951	1.838	1.905
จังหวัดสระบุรี	10000	1.161	1.121	1.198
	1000	1.597	1.642	1.564
	100	1.667	1.608	1.725
	10	1.777	1.733	1.772
	1	1.856	1.805	1.877
control		2.687		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดหยาบส่วนก้าน	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
จังหวัดบุรีรัมย์	10000	0.978	1.035	1.098
	1000	1.739	1.774	1.642
	100	1.672	1.869	1.750
	10	1.806	1.795	1.773
	1	1.982	1.990	2.030
จังหวัดสระบุรี	10000	0.889	1.002	0.840
	1000	1.1614	1.642	1.495
	100	1.710	1.667	1.670
	10	1.935	1.756	1.875
	1	1.862	1.844	2.001
control		2.6868		

ตัวอย่างการคำนวณ

สารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์ ซ้ำที่ 1 ที่ความเข้มข้น 10000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากสมการ % Cytotoxicity = [(A-B)/A] x 100

A = 1.5762 B = 0.399 – 0.0344

% Cytotoxic = [(1.5762-0.3646)/1.5762] x 100

= 76.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ-4 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดหยาบส่วนใบ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
จังหวัดบุรีรัมย์	10000	76.59	77.29	77.48	77.12
	1000	15.11	10.04	27.04	17.39
	100	23.49	25.77	34.78	28.01
	10	21.96	17.08	28.37	22.47
	1	8.26	7.82	8.45	8.17
จังหวัดสระบุรี	10000	87.82	89.40	79.70	85.64
	1000	20.44	17.59	23.17	20.40
	100	22.98	19.62	17.33	19.97
	10	19.36	16.19	15.81	17.12
	1	8.77	11.62	12.32	10.90

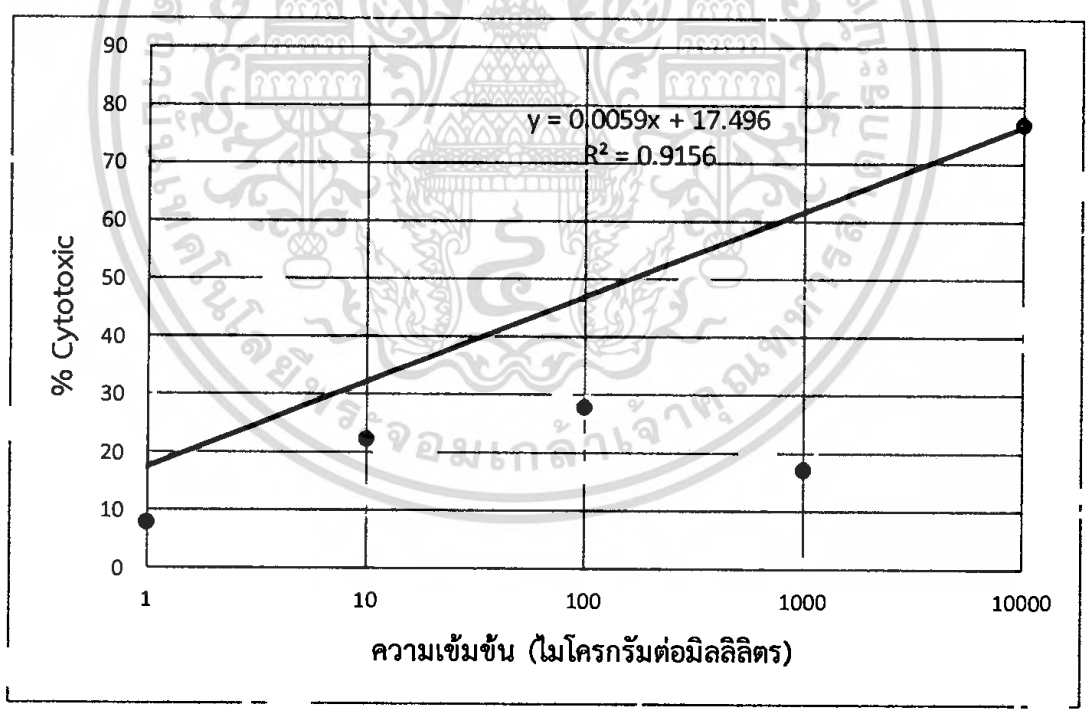
ตารางที่ ฉ-5 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดหยาบส่วนกิ่ง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
จังหวัดบุรีรัมย์	10000	62.05	62.80	63.28	62.71
	1000	41.55	42.07	38.68	40.76
	100	35.56	37.71	43.82	39.03
	10	30.53	31.98	30.76	31.09
	1	28.63	32.84	30.35	30.65
จังหวัดสระบุรี	10000	58.03	59.52	56.66	58.07
	1000	41.81	40.13	43.04	41.66
	100	39.20	41.40	37.04	39.21
	10	35.10	36.75	35.30	35.71
	1	32.17	34.07	31.39	32.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

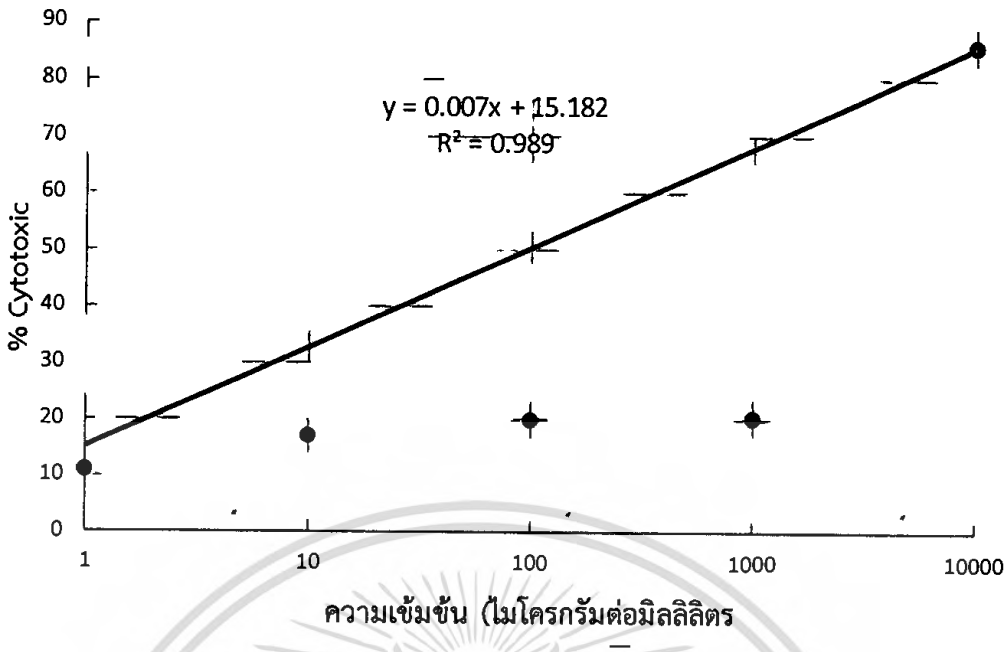
ตารางที่ ฉ-6 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอินที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดหยาบส่วนก้าน	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
จังหวัดบุรีรัมย์	10000	64.85	62.73	60.38	62.65
	1000	36.53	35.22	40.14	37.29
	100	39.02	31.69	36.12	35.61
	10	34.03	34.44	35.26	34.57
	1	27.48	27.18	25.70	26.78
จังหวัดสระบุรี	10000	68.16	63.96	69.99	67.37
	1000	41.17	40.14	45.61	42.30
	100	37.61	39.20	39.09	38.63
	10	29.23	35.89	31.36	32.16
	1	31.95	32.62	26.77	30.44

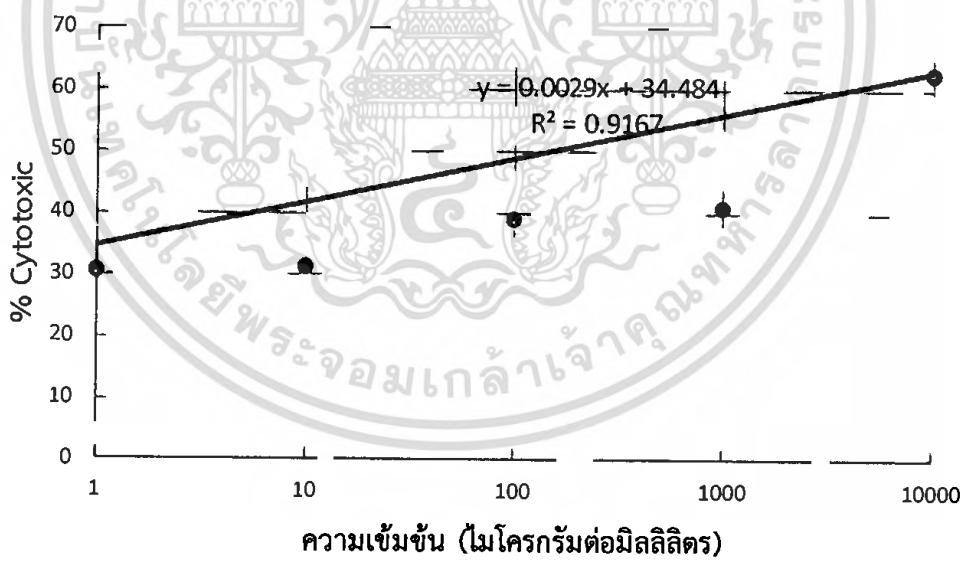


รูปที่ ฉ-1 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอิน จากจังหวัดบุรีรัมย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

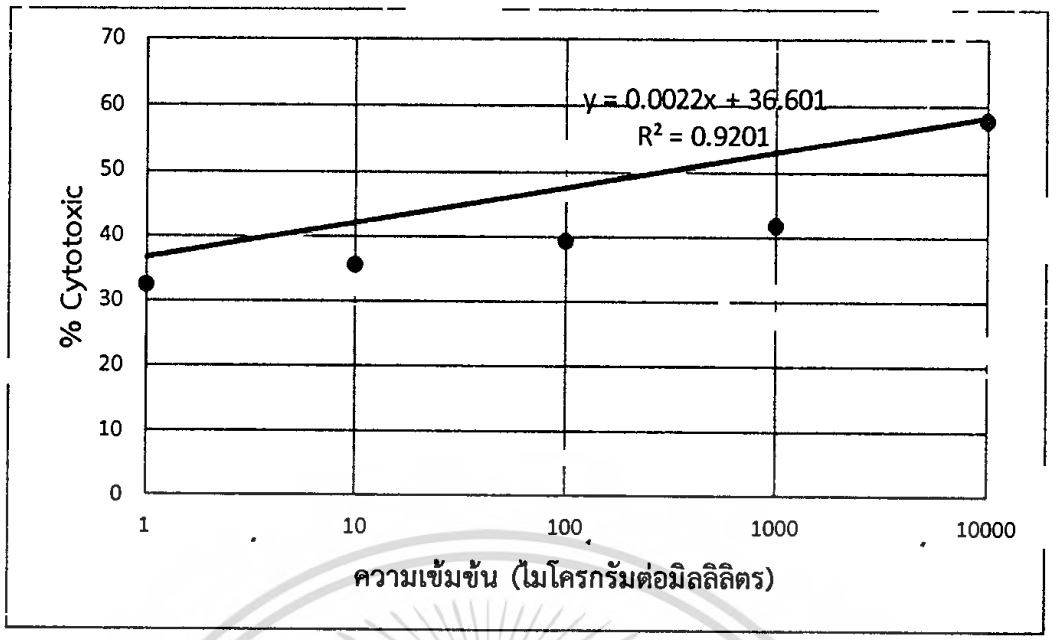


รูปที่ ฉ-2 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนใบของต้นจันอิน จากจังหวัดสระบุรี

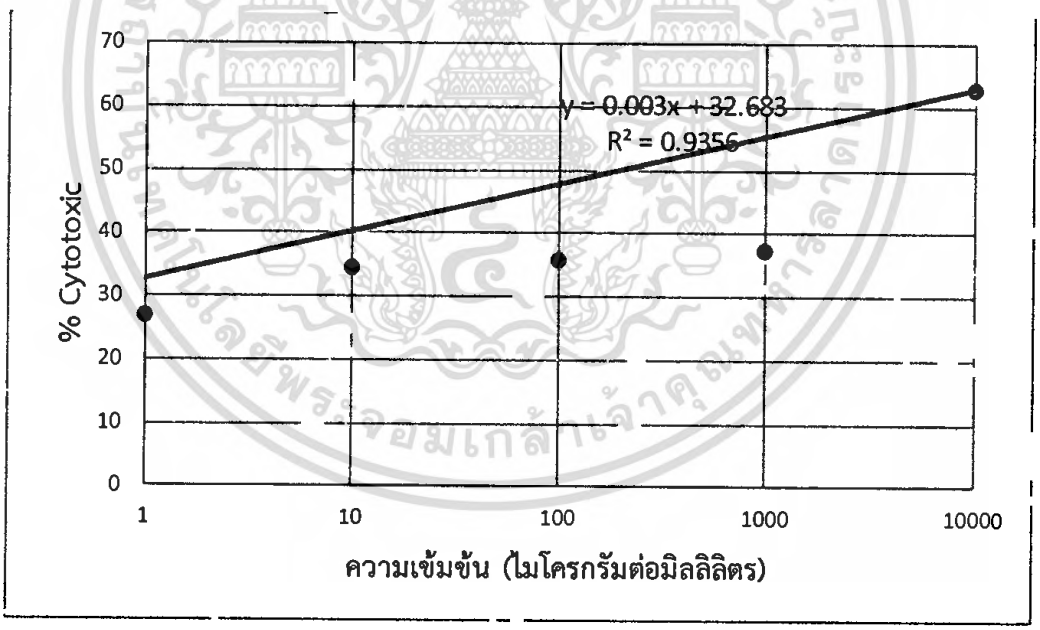


รูปที่ ฉ-3 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอิน จากจังหวัดบุรีรัมย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

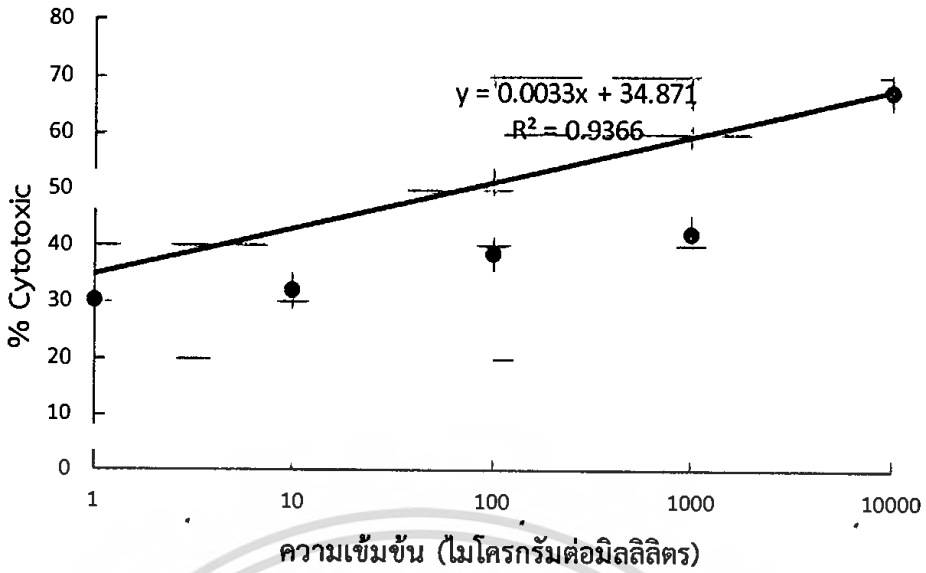


รูปที่ ฉ-4 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งของต้นจันอิน จากจังหวัดสระบุรี



รูปที่ ฉ-5 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอิน จากจังหวัดบุรีรัมย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ-6 กราฟแสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบส่วนก้านของต้นจันอิน จากจังหวัดสระบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การหาสารพฤกษเคมี

1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน

Oneway

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ใบ (บุรีรัมย์)	3	0.027935	0.0092422	0.0053360	0.004976	0.050894	0.0202	0.0382
ใบ (สระบุรี)	3	0.015353	0.0013297	0.0007677	0.012050	0.018657	0.0140	0.0166
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3	0.012896	0.0017775	0.0010262	0.008481	0.017312	0.0110	0.0146
กิ่ง (สระบุรี)	3	0.018794	0.0013620	0.0007863	0.015410	0.022177	0.0172	0.0196
ก้าน (บุรีรัมย์)	3	0.010144	0.0010632	0.0006138	0.007503	0.012785	0.0090	0.0110
ก้าน (สระบุรี)	3	0.003165	0.0003405	0.0001966	0.002319	0.004011	0.0028	0.0034
Total	18	0.014715	0.0085238	0.0020091	0.010476	0.018953	0.0028	0.0382

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.001	5	0.000	13.461	0.000
Within Groups	0.000	12	0.000		
Total	0.001	17			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Phenolic					
Duncan[a]					
		Subset for alpha = 0.05			
Crude	N	1	2	3	4
ใบ (บุรีรัมย์)	3	0.003165			
ใบ (สระบุรี)	3	0.010144	0.010144		
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3		0.012896	0.012896	
กิ่ง (สระบุรี)	3		0.015353	0.015353	
ก้าน (บุรีรัมย์)	3			0.018794	
ก้าน (สระบุรี)	3				0.027935
Sig.		0.051	0.149	0.106	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้าน ของต้นจันอิน

Descriptives								
Flavanoid								
					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
ใบ (บุรีรัมย์)	3	608.333	47.3242	27.3227	490.773	725.893	575.0	662.5
ใบ (สระบุรี)	3	975.000	12.5000	7.2169	943.948	1006.052	962.5	987.5
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3	562.500	33.0719	19.0941	480.345	644.655	525.0	587.5
กิ่ง (สระบุรี)	3	237.500	12.5000	7.2169	206.448	268.552	225.0	250.0
ก้าน (บุรีรัมย์)	3	116.667	31.4576	18.1621	38.522	194.812	87.5	150.0
ก้าน (สระบุรี)	3	108.333	19.0941	11.0240	60.901	155.766	87.5	125.0
Total	18	434.722	322.2039	75.9442	274.494	594.950	87.5	987.5

ANOVA					
Flavanoid					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1754861.111	5	350972.222	421.167	0.000
Within Groups	10000.000	12	833.333		
Total	1764861.111	17			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Flavanoid					
Duncan[a]					
		Subset for alpha = 0.05			
Crude	N	1	2	3	4
ก้าน (บุรีรัมย์)	3	108.333			
ก้าน (สระบุรี)	3	116.667			
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3		237.500		
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3			562.500	
ใบ (บุรีรัมย์)	3			608.333	
ใบ (สระบุรี)	3				975.000
Sig.		0.730	1.000	0.076	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 แสดงปริมาณของสารแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้าน ของต้นจันอิน

Descriptives								
Tannin								
					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
ใบ (บุรีรัมย์)	3	324.5533	43.37776	25.04416	216.7970	432.3097	282.33	369.00
ใบ (สระบุรี)	3	235.6667	3.33500	1.92546	227.3821	243.9513	232.33	239.00
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3	250.1100	27.14768	15.67372	182.6714	317.5486	219.00	269.00
กิ่ง (สระบุรี)	3	150.1100	15.75389	9.09552	110.9752	189.2448	132.33	162.33
ก้าน (บุรีรัมย์)	3	190.1100	28.34777	16.36660	119.6902	260.5298	169.00	222.33
ก้าน (สระบุรี)	3	183.4467	10.71586	6.18680	156.8270	210.0663	175.67	195.67
Total	18	222.3328	61.87637	14.58440	191.5624	253.1032	132.33	369.00

ANOVA					
Tannin					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	57494.926	5	11498.985	18.174	0.000
Within Groups	7592.719	12	632.727		
Total	65087.645	17			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Tannin				
Duncan[a]				
		Subset for alpha = 0.05		
Crude	N	1	2	3
กิ่ง (สระบุรี)	3	150.1100		
ก้าน (สระบุรี)	3	183.4467		
ก้าน (บุรีรัมย์)	3	190.1100		
ใบ (สระบุรี)	3		235.6667	
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3		250.1100	
ใบ (บุรีรัมย์)	3			324.5533
Sig.		0.088	0.495	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 แสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินในสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้าน ของต้นจันอิน

Descriptives								
Anthocyanin								
					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
ใบ (บุรีรัมย์)	3	15.58567	15.059896	8.694835	-21.82519	52.99652	0.000	30.058
ใบ (สระบุรี)	3	27.27500	6.321946	3.649977	11.57042	42.97958	20.039	31.728
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3	26.71833	16.103756	9.297508	-13.28561	66.72228	15.029	45.087
กิ่ง (สระบุรี)	3	20.59533	8.237340	4.755830	0.13265	41.05802	15.029	30.058
ก้าน (บุรีรัมย์)	3	55.10633	69.916262	40.366173	-118.57529	228.78796	6.680	135.261
ก้าน (สระบุรี)	3	39.52067	42.845819	24.737045	-66.91425	145.95558	3.340	86.834
Total	18	30.80022	32.295177	7.612046	14.74021	46.86024	0.000	135.261

ANOVA					
Anthocyanin					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3094.634	5	618.927	0.507	0.766
Within Groups	14636.000	12	1219.667		
Total	17730.634	17			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Anthocyanin		
Duncan[a]		
สารสกัดหยาบ	N	Subset for alpha = 0.05 1
ใบ (บุรีรัมย์)	3	15.58567
กิ่ง (สระบุรี)	3	20.59533
กิ่ง (บุรีรัมย์)	3	26.71833
ใบ (สระบุรี)	3	27.27500
ก้าน (สระบุรี)	3	39.52067
ก้าน (บุรีรัมย์)	3	55.10633
Sig.		0.233
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.		
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากต้นจันอิน

2.1 แสดงร้อยละของคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนใบ กิ่ง และก้านของต้นจันอิน

Descriptives

DPPH

Crude	Conc.	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ใบ บุรีรัมย์	10 mg/ml	3	85.0977	0.18174	0.10493	84.6462	85.5491	84.92	85.28
	5 mg/ml	3	71.1040	2.85620	1.64903	64.0089	78.1992	68.01	73.65
	2.5 mg/ml	3	56.0200	0.65526	0.37831	54.3922	57.6477	55.47	56.75
	1.25 mg/ml	3	45.3582	0.81949	0.47313	43.3224	47.3939	44.57	46.21
ใบ สระบุรี	10 mg/ml	3	82.9774	0.58420	0.33729	81.5262	84.4287	82.55	83.64
	5 mg/ml	3	74.6176	2.78200	1.60619	67.7067	81.5285	72.92	77.83
	2.5 mg/ml	3	54.5055	1.27647	0.73697	51.3346	57.6765	53.29	55.84
	1.25 mg/ml	3	40.0878	1.86519	1.07687	35.4545	44.7212	38.03	41.66
กิ่ง บุรีรัมย์	10 mg/ml	3	87.2179	0.10493	0.06058	86.9573	87.4786	87.10	87.28
	5 mg/ml	3	71.8916	0.37831	0.21842	70.9518	72.8313	71.47	72.19
	2.5 mg/ml	3	50.3256	0.45736	0.26406	49.1895	51.4617	49.84	50.75
	1.25 mg/ml	3	25.4884	0.65526	0.37831	23.8607	27.1162	24.94	26.22
กิ่ง สระบุรี	10 mg/ml	3	85.4612	0.31478	0.18174	84.6792	86.2431	85.28	85.82
	5 mg/ml	3	72.5579	4.70060	2.71389	60.8810	84.2349	68.38	77.65
	2.5 mg/ml	3	55.0507	3.37722	1.94984	46.6613	63.4402	52.75	58.93
	1.25 mg/ml	3	30.0924	1.51325	0.87368	26.3333	33.8515	28.40	31.30
ก้าน บุรีรัมย์	10 mg/ml	3	55.4142	0.45736	0.26406	54.2781	56.5503	54.93	55.84
	5 mg/ml	3	42.5110	1.18245	0.68269	39.5736	45.4483	41.30	43.66
	2.5 mg/ml	3	39.6032	1.27647	0.73697	36.4323	42.7741	38.39	40.94
	1.25 mg/ml	3	37.8464	0.83282	0.48083	35.7776	39.9153	37.12	38.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก้านสระบุรี	10 mg/ml	3	51.1131	1.09041	0.62955	48.4044	53.8219	50.02	52.20
	5 mg/ml	3	46.2063	5.37888	3.10550	32.8444	59.5682	42.57	52.39
	2.5 mg/ml	3	32.1521	1.68861	0.97492	27.9573	36.3468	30.76	34.03
	1.25 mg/ml	3	27.7904	1.63898	0.94627	23.7189	31.8619	26.22	29.49
Vit E	0.5 mM	3	91.6402	0.31478	0.18174	90.8582	92.4221	91.46	92.00
	Total	75	56.4852	20.25274	2.33859	51.8255	61.1450	24.94	92.00

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30155.141	24	1256.464	317.763	0.000
Within Groups	197.705	50	3.954		
Total	30352.846	74			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

สารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดบุรีรัมย์

% DPPH						
Duncan[a]						
Crude	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1.25 mg/ml	3	45.3582				
2.5 mg/ml	3		56.0200			
5 mg/ml	3			71.1040		
10 mg/ml2	3				85.0977	
Vit E	3					91.6402
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

สารสกัดหยาบส่วนใบจากจังหวัดสระบุรี

% DPPH						
Duncan[a]						
		Subset for alpha = 0.05				
Crude	N	1	2	3	4	5
1.25 mg/ml	3	40.0878				
2.5 mg/ml	3		54.5055			
5 mg/ml	3			74.6176		
10 mg/ml	3				82.9774	
Vit E	3					91.6402
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดบุรีรัมย์

% DPPH						
Duncan[a]						
		Subset for alpha = 0.05				
Crude	N	1	2	3	4	5
1.25 mg/ml	3	25.4884				
2.5 mg/ml	3		50.3256			
5 mg/ml	3			71.8916		
10 mg/ml	3				87.2179	
Vit E	3					91.6402
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

สารสกัดหยาบส่วนกิ่งจากจังหวัดสระบุรี

% DPPH						
Duncan[a]						
		Subset for alpha = 0.05				
Crude	N	1	2	3	4	5
1.25 mg/ml	3	30.0923				
2.5 mg/ml	3		55.0507			
5 mg/ml	3			72.5579		
10 mg/ml	3				85.4611	
Vit E	3					91.6402
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดบุรีรัมย์

% DPPH						
Duncan[a]						
		Subset for alpha = 0.05				
Crude	N	1	2	3	4	5
1.25 mg/ml	3	37.8464				
2.5 mg/ml	3		39.6032			
5 mg/ml	3			42.5109		
10 mg/ml	3				55.4142	
Vit E	3					91.6402
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

สารสกัดหยาบส่วนก้านจากจังหวัดสระบุรี

% DPPH					
Duncan[a]					
		Subset for alpha = 0.05			
Crude	N	1	2	3	4
1.25 mg/ml	3	27.7903			
2.5 mg/ml	3	32.1520			
5 mg/ml	3		46.2062		
10 mg/ml	3			51.1131	
Vit E	3				91.6402
Sig.		0.074	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

% DPPH

Duncan[a]

Crude	N	Subset for alpha = 0.05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
กิ่ง บุรีรัมย์ (1.25)	3	25.4884												
ก้าน สระบุรี (1.25)	3	27.7904	27.7904											
กิ่ง สระบุรี (1.25)	3		30.0924	30.0924										
ก้าน สระบุรี (2.5)	3			32.1521										
ก้าน บุรีรัมย์ (1.25)	3				37.8464									
ก้าน บุรีรัมย์ (2.5)	3				39.6032	39.6032								
ใบ สระบุรี (1.25)	3				40.0878	40.0878								
ก้าน บุรีรัมย์ (5)	3					42.5110	42.5110							
ใบ บุรีรัมย์ (1.25)	3						45.3582	45.3582						
ก้าน สระบุรี (5)	3							46.2063						
กิ่ง บุรีรัมย์ (2.5)	3								50.3256					
ก้าน สระบุรี (10)	3								51.1131					
ใบ สระบุรี (2.5)	3									54.5055				
กิ่ง สระบุรี (2.5)	3									55.0507				
ก้าน บุรีรัมย์ (10)	3									55.4142				
ใบ บุรีรัมย์ (2.5)	3									56.0200				
ใบ บุรีรัมย์ (5)	3										71.1040			
กิ่ง บุรีรัมย์ (5)	3										71.8916			
กิ่ง สระบุรี (5)	3										72.5579			
ใบ สระบุรี (5)	3										74.6176			
ใบ สระบุรี (10)	3											82.9774		
ใบ บุรีรัมย์ (10)	3											85.0977	85.0977	
กิ่ง สระบุรี (10)	3											85.4612	85.4612	
กิ่ง บุรีรัมย์ (10)	3												87.2179	
Vit E	3													91.6402
Sig.		0.162	0.162	0.210	0.199	0.096	0.086	0.604	0.630	0.403	0.052	0.155	0.225	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

3.1 แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษของเซลล์ (% Cytotoxic) ของสารสกัดหยาบจันอิน ที่ความเข้มข้น 10,000 1,000 100 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Oneway

Descriptives

cc50

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ใบบุรีรัมย์ (10000)	3	77.1200	0.46872	0.27062	75.9556	78.2844	76.59	77.48
ใบบุรีรัมย์ (1000)	3	17.3967	8.72764	5.03890	-4.2840	39.0773	10.04	27.04
ใบบุรีรัมย์ (100)	3	28.0133	5.96996	3.44676	13.1831	42.8435	23.49	34.78
ใบบุรีรัมย์ (10)	3	22.4700	5.66225	3.26910	8.4042	36.5358	17.08	28.37
ใบบุรีรัมย์ (1)	3	8.1767	0.32316	0.18658	7.3739	8.9794	7.82	8.45
กิ่งบุรีรัมย์ (10000)	3	62.7100	0.61992	0.35791	61.1700	64.2500	62.05	63.28
กิ่งบุรีรัมย์ (1000)	3	40.7667	1.82571	1.05408	36.2313	45.3020	38.68	42.07
กิ่งบุรีรัมย์ (100)	3	39.0300	4.28529	2.47411	28.3848	49.6752	35.56	43.82
กิ่งบุรีรัมย์ (10)	3	31.0900	0.77929	0.44993	29.1541	33.0259	30.53	31.98
กิ่งบุรีรัมย์ (1)	3	30.6067	2.11670	1.22208	25.3485	35.8648	28.63	32.84
ก้านบุรีรัมย์ (10000)	3	62.6533	2.23599	1.29095	57.0988	68.2078	60.38	64.85
ก้านบุรีรัมย์ (1000)	3	37.2967	2.54803	1.47110	30.9670	43.6263	35.22	40.14
ก้านบุรีรัมย์ (100)	3	35.6100	3.69152	2.13130	26.4398	44.7802	31.69	39.02
ก้านบุรีรัมย์ (10)	3	34.5767	0.62629	0.36159	33.0209	36.1324	34.03	35.26
ก้านบุรีรัมย์ (1)	3	26.7867	0.95296	0.55019	24.4194	29.1540	25.70	27.48
ใบสระบุรี (10000)	3	85.6400	5.20450	3.00482	72.7113	98.5687	79.70	89.40
ใบสระบุรี (1000)	3	20.4000	2.79022	1.61093	13.4687	27.3313	17.59	23.17
ใบสระบุรี (100)	3	19.9767	2.84184	1.64073	12.9172	27.0362	17.33	22.98
ใบสระบุรี (10)	3	17.1200	1.94918	1.12536	12.2780	21.9620	15.81	19.36
ใบสระบุรี (1)	3	10.9033	1.88038	1.08564	6.2322	15.5745	8.77	12.32
กิ่งสระบุรี (10000)	3	58.0700	1.43042	0.82585	54.5166	61.6234	56.66	59.52
กิ่งสระบุรี (1000)	3	41.6600	1.46079	0.84339	38.0312	45.2888	40.13	43.04
กิ่งสระบุรี (100)	3	39.2133	2.18003	1.25864	33.7978	44.6288	37.04	41.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิ่งสระบุรี (10)	3	35.7167	0.90046	0.51988	33.4798	37.9535	35.10	36.75
กิ่งสระบุรี (1)	3	32.5433	1.37845	0.79585	29.1191	35.9676	31.39	34.07
ก้านสระบุรี (10000)	3	67.3700	3.09165	1.78496	59.6899	75.0501	63.96	69.99
ก้านสระบุรี 1000)	3	42.3067	2.90676	1.67822	35.0859	49.5275	40.14	45.61
ก้านสระบุรี (100)	3	38.6333	0.88794	0.51265	36.4276	40.8391	37.61	39.20
ก้านสระบุรี (10)	3	32.1600	3.40131	1.96375	23.7107	40.6093	29.23	35.89
ก้านสระบุรี (1)	3	30.4467	3.20166	1.84848	22.4933	38.4000	26.77	32.62
Total	90	37.5488	18.68024	1.96907	33.6363	41.4613	7.82	89.40

ANOVA

cc50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30456.027	29	1050.208	104.906	0.000
Within Groups	600.657	60	10.011		
Total	31056.684	89			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cc50

Duncan[a]

crude	N	Subset for alpha = 0.05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ใบบุรีรัมย์ (1)	3	8.1767												
ใบสระบุรี (1)	3	10.9033												
ใบสระบุรี (10)	3		17.1200											
ใบบุรีรัมย์ (1000)	3		17.3967											
ใบสระบุรี (100)	3		19.9767											
ใบสระบุรี (1000)	3		20.4000											
ใบบุรีรัมย์ (10)	3		22.4700	22.4700										
ก้านบุรีรัมย์ (1)	3			26.7867	26.7867									
ใบบุรีรัมย์ (100)	3				28.0133									
ก้านสระบุรี (1)	3				30.4467	30.4467								
กิ่งบุรีรัมย์ (1)	3				30.6067	30.6067								
กิ่งบุรีรัมย์ (10)	3				31.0900	31.0900								
ก้านสระบุรี (10)	3				32.1600	32.1600	32.1600							
กิ่งสระบุรี (1)	3				32.5433	32.5433	32.5433							
ก้านบุรีรัมย์ (10)	3					34.5767	34.5767	34.5767						
ก้านบุรีรัมย์ (100)	3					35.6100	35.6100	35.6100	35.6100					
กิ่งสระบุรี (10)	3					35.7167	35.7167	35.7167	35.7167					
ก้านบุรีรัมย์ (1000)	3						37.2967	37.2967	37.2967	37.2967				
ก้านสระบุรี (100)	3							38.6333	38.6333	38.6333				
กิ่งบุรีรัมย์ (100)	3							39.0300	39.0300	39.0300				
กิ่งสระบุรี (100)	3							39.2133	39.2133	39.2133				
กิ่งบุรีรัมย์ (1000)	3								40.7667	40.7667				
กิ่งสระบุรี (10000)	3									41.6600				
ก้านสระบุรี (1000)	3									42.3067				
กิ่งสระบุรี (10000)	3										58.0700			
ก้านบุรีรัมย์ (10000)	3										62.6533	62.6533		
กิ่งบุรีรัมย์ (10000)	3										62.7100	62.7100		
ก้านบุรีรัมย์ (10000)	3											67.3700		
ใบบุรีรัมย์ (10000)	3												77.1200	
ใบสระบุรี (10000)	3													85.6400
Sig.		0.295	0.068	0.100	0.057	0.085	0.086	0.127	0.089	0.099	0.094	0.089	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.